



**Telma
Alexandra
Neves dos
Santos**

Estudo da fotodegradação de diclofenac e citalopram



**Telma
Alexandra
Neves dos
Santos**

Estudo da fotodegradação de diclofenac e citalopram

Dissertação apresentada no Departamento de Química da Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química - Especialidade em Química Analítica e Qualidade, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Valdemar Inocêncio Esteves, Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, do Professor Doutor Mário Manuel Quialheiro Simões, Professor Auxiliar Do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Vânia Maria Amaro Calisto, Estagiária de Pós-Doutoramento no Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

À minha família.

O Júri

Presidente

Prof. Doutor Artur Manuel Soares da Silva

Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Olga Manuela Simão Filipe

Professora Adjunta da Escola Superior Agrária de Coimbra

Prof. Doutor Valdemar Inocêncio Esteves

Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Para a conclusão deste trabalho muitas pessoas contribuíram para a sua finalização, a todos o meu sincero agradecimento.

Aos meus orientadores, Professor Doutor Valdemar Esteves e Professor Doutor Mário Simões, pela paciência, disponibilidade e conhecimentos transmitidos, obrigada por tudo.

Um agradecimento muito especial à Doutora Vânia Calisto, orientadora deste trabalho, cujo contributo foi crucial para a sua conclusão. Por nunca teres desistido, pela tua paciência, amizade, partilha de conhecimentos e total disponibilidade, obrigada de coração.

Gostaria também de agradecer à Professora Doutora Maria do Rosário e à Doutora Cristina Barros, pela cooperação na parte de espetrometria de massa.

À Doutora Mónica Válega, pela disponibilidade, preocupação e amizade transmitida, obrigada.

Aos meus colegas de laboratório e amigos a quem chamo "companheiros de guerra", obrigada por tudo. Queria deixar um agradecimento especial à Sónia Lopes e Daniela Neto pelo apoio. À Andreia Paula, amiga de infância, de faculdade e companheira de todas as horas, obrigada ursinha.

Finalmente, aos pilares da minha vida, à minha família, especialmente à minha avó, mãe e irmã, que tantas lágrimas secaram, obrigada por serem "minhas". Ao meu namorado, Danny Gomes, obrigada por me aturares.

Palavras-chave Citalopram, diclofenac, água, fármacos, fotodegradação, porfirinas, ambiente, HPLC

Resumo Na última década, os fármacos têm sido apontados como importantes poluentes ambientais. Estes são compostos biologicamente ativos, podendo ser persistentes e portanto reconhecidos como uma ameaça contínua para o ambiente. Os compostos originais e/ou os respectivos metabolitos estão constantemente a ser depositados no ambiente, sendo a excreção pelo ser humano (urina e fezes) a principal forma de entrada, uma vez que as Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETARs) não são, na generalidade, eficazes na sua eliminação.

A fotodegradação é uma das principais vias de degradação abiótica de contaminantes nas águas naturais. Neste trabalho, irão ser abordados dois fármacos de classes diferentes, o diclofenac (anti-inflamatório) e o citalopram (antidepressivo). Estes fármacos foram submetidos a fotodegradação direta, através de radiação solar simulada, por forma a estudar a sua persistência no ambiente. Este estudo demonstrou que a velocidade de degradação do diclofenac é maior comparativamente com a velocidade de degradação do citalopram, sendo o tempo de meia vida de 0,057 SSD e 17 SSD, respetivamente.

Adicionalmente aos estudos de fotodegradação direta, para o citalopram foi também efetuado o estudo do efeito do oxigénio dissolvido em solução aquosa. Estes estudos foram seguidos pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e alguns produtos de fotodegradação foram identificados por espetrometria de massa (MS). Para este fármaco foi também efetuado o estudo com a porfirina H₂TDMImP como fotossensibilizador por forma a avaliar o seu efeito na velocidade de degradação do citalopram, tendo esta aumentado em cerca de 6 vezes na presença de H₂TDMImP.

Keywords

Citalopram, diclofenac, water, pharmaceuticals, photodegradation, porphyrins, environment, HPLC

Abstract

During the last decade, pharmaceuticals have been identified as severe environmental pollutants. These are biologically active substances that can be persistent and are recognized as a continuous threat to the environment. The original substances and/or their metabolites are constantly thrown into the environment, being human excretions (urine and faeces) the main form of insertion, since Waste Water Treatment Plants (WWTP's) are, in general, not efficient in their elimination.

Photodegradation is one of the main processes of abiotic degradation of contaminants in mineral water. This work will approach two pharmaceuticals of different classes: diclofenac (anti-inflammatory) and citalopram (antidepressive). These pharmaceuticals were subjected to direct photodegradation, through simulated solar irradiation, in order to assess their persistence in the environment. It was verified that the degradation rate of diclofenac is higher than that of citalopram, being their half lifetime of about 0.057 SSD and 17 SSD, respectively.

Besides these direct photodegradation experiments with both pharmaceuticals, the effect of dissolved oxygen in the aqueous solution was also studied with citalopram. These tests were followed by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), and some of the products of photodegradation were identified by mass spectrometry (MS). Moreover, an experiment with the H₂TDMImP porphyrin as a photosensitizer was also performed, in order to assess its effect on the degradation rate of citalopram, which increased over 6 times in the presence of the H₂TDMImP.

Índice

| | |
|--|------------|
| Índice | i |
| Lista de figuras | iii |
| Lista de tabelas | vii |
| Glossário | ix |
| 1. Introdução | 1 |
| 1.1. Considerações gerais | 1 |
| 2. Revisão da literatura | 3 |
| 2.1. Fármacos no ambiente | 3 |
| 2.2. Fontes de contaminação e métodos de tratamento | 4 |
| 2.3. Fármacos em estudo | 8 |
| 2.3.1. Antidepressivos | 8 |
| 2.3.2. Anti-inflamatórios não esteróides (AINEs)..... | 16 |
| 2.4. Processos de Fotodegradação no ambiente | 22 |
| 2.4.1. Luz simulada versus luz natural | 23 |
| 2.4.2. Fotossensibilizadores | 24 |
| 2.5. Legislação..... | 28 |
| 3. Materiais e métodos experimentais | 29 |
| 3.1. Reagentes..... | 29 |
| 3.2. Lavagem do material de vidro | 29 |
| 3.3. Preparação de soluções aquosas | 29 |
| 3.4. Instrumento de irradiação | 30 |
| 3.4.1. Irradiação e preparação das amostras | 30 |
| 3.5. Curva de calibração-Diclofenac | 31 |
| 3.6. Curva de calibração-Citalopram..... | 31 |
| 3.7. Análise por Cromatografia Líquida de alta eficiência (HPLC) com detetor UV . | 31 |
| 3.7.1. Análise do diclofenac por HPLC | 32 |
| 3.7.2. Análise do citalopram por HPLC | 33 |
| 3.8. Estudo da fotodegradação na presença da porfirina (H ₂ TDMImP) | 34 |
| 3.9. Estudo do efeito do oxigénio dissolvido (Citalopram)..... | 34 |
| 3.9.1. Produtos de fotodegradação - Espetrometria de Massa | 35 |

| | |
|---|-----------|
| 4. Tratamento e discussão de resultados..... | 37 |
| 4.1. Determinação do diclofenac por HPLC-UV | 37 |
| 4.2. Cinética de fotodegradação do diclofenac (10 mg L ⁻¹) | 39 |
| 4.3. Determinação do citalopram por HPLC-UV | 40 |
| 4.4. Cinética de fotodegradação de citalopram (5 mg L ⁻¹)..... | 41 |
| 4.5. Efeito da porfirina sobre a fotodegradação do citalopram (5 mg L ⁻¹)..... | 43 |
| 4.5.1. Cinéticas de fotodegradação do citalopram na presença da porfirina H ₂ TDMImp | 44 |
| 4.5.2. Cinética de fotodegradação do citalopram (5 mg L ⁻¹) borbulhado com N ₂ ... | 46 |
| 4.6. Relevância dos resultados em termos ambientais | 47 |
| 4.7. Produtos resultantes da fotodegradação do citalopram por HPLC..... | 48 |
| 4.7.1. Identificação de produtos de fotodegradação do citalopram por Espetrometria de Massa | 49 |
| 5. Conclusões | 62 |
| Referências | 63 |

Lista de figuras

Capítulo 2- Fármacos no ambiente

- Figura 2.1:** Diferentes formas de entrada de fármacos no ambiente. 6
- Figura 2.2:** a) Consumo global de antidepressivos, DDD/1000 habitantes/dia (OECD, 2011) e b) Consumo global de antidepressivos, DDD/1000 habitantes/dia (OECD, 2015). 9
- Figura 2.3:** Estruturas químicas dos compostos pertencentes à classe ISRSs. 10
- Figura 2.4:** Metabolismo hepático do citalopram (Unceta, Goicolea, and Barrio 2011). 12
- Figura 2.5:** Estruturas químicas dos compostos pertencentes à classe AINEs. 16
- Figura 2.6:** Metabolismo do diclofenac catalisado pelo citocromo P450 (Ngui et al. 2000). 18
- Figura 2.7:** Solarbox utilizada para o desenvolvimento do estudo da fotodegradação do citalopram (Solarbox 1500, Co.fo.me.gra, Itália) equipado com sensor de UV, sensor de temperatura e um suporte de amostra. 23
- Figura 2.8:** a) Espectro de irradiância de uma lâmpada arco xenon de 1500 W utilizando um filtro UV (outdoor) fornecido pelo fabricante (Solarbox 1500, Co.fo.me.gra, Itália). Este espectro é referido para uma irradiância de 550 W m⁻² entre 290-800 nm. b) Espectro de irradiância do sol obtido pela fonte do projeto SOURCE (NASA, 2008). Este espectro refere-se ao dia 23 de Julho de 2008, e os valores foram médios por forma a fornecer a radiação solar (adaptado de V. M. A. Calisto 2011). 24
- Figura 2.9:** Espectro UV-VIS típico de uma porfirina. 26

Capítulo 3- Materiais e métodos experimentais

- Figura 3.1:** Sequência dos tubos de quartzo no interior da SolarBox (**controlo 1**, tubos 1, 2 e 3 e **controlo 2 e 3**, respetivamente). 30
- Figura 3.2:** Espectro de UV-VIS para uma solução de diclofenac de 10 mg L⁻¹, obtido utilizando um espectrofotómetro Shimadzu usando uma célula com um percurso ótico de 1 cm. 32

Capítulo 4- Tratamento e discussão dos resultados

- Figura 4.1:** Cromatograma obtido para a solução stock de diclofenac 10 mg L⁻¹. 37
- Figura 4.2:** Curva de calibração do DCF (área do pico *versus* concentração das soluções padrão de DCF). 38
- Figura 4.3:** Cinética de pseudo-1ª ordem da fotodegradação da solução de DCF 10 mg L⁻¹. Cada ponto é referente a três réplicas ($\pm s$). 39
- Figura 4.4:** Cromatograma de HPLC obtido para a solução stock de CIT 5 mg L⁻¹. 41
- Figura 4.5:** Curva de calibração do CIT (área do pico *versus* concentração das soluções padrão de CIT). Cada padrão foi analisado em triplicado. 41
- Figura 4.6:** Cinética de pseudo-1ª ordem da fotodegradação da solução de CIT 5 mg L⁻¹. Cada ponto é referente a três réplicas ($\pm s$). 42
- Figura 4.7:** Espetros UV-Vis para uma solução de porfirina 5 mg L⁻¹ não irradiada, e com 5 e 24 horas de irradiação e os respectivos controles, utilizando um espectrofotômetro Shimadzu e usando uma célula com um percurso ótico de 1 cm. 43
- Figura 4.8:** a) Cinética de pseudo-1ª ordem da fotodegradação da solução de CIT 5 mg L⁻¹ e porfirina 5 mg L⁻¹. b) Cinética de pseudo-1ª ordem da fotodegradação da solução de CIT 5 mg L⁻¹ e porfirina 10 mg L⁻¹. Cada ponto é referente a três réplicas ($\pm s$). 44
- Figura 4.9:** Cinética de pseudo-1ª ordem da fotodegradação da solução de CIT 5 mg L⁻¹, porfirina 5 mg L⁻¹ e azida de sódio (4 mg L⁻¹). Cada ponto é referente à média de três réplicas ($\pm s$). 45
- Figura 4.10:** Cinética de pseudo-1ª ordem da fotodegradação da solução de CIT 5 mg L⁻¹, borbulhado com N₂. Cada ponto é referente a três réplicas ($\pm s$). 46
- Figura 4.11:** Cromatograma obtido para a solução de CIT 5 mg L⁻¹ borbulhada com O₂ durante 50h. 49
- Figura 4.12:** A) Espectro de massa do padrão (m/z 325); B) Espectro MS² de m/z 325; C) Espectro MS³ do ião fragmento m/z 307; D) Espectro MS⁴ do ião fragmento m/z 262; E) Espectro MS⁴ do ião fragmento m/z 184. 51
- Figura 4.13:** Perfil das vias de fragmentação do citalopram. 52
- Figura 4.14:** Estruturas propostas para o ião com m/z 262 (Sharma et al. 2011). 53
- Figura 4.15:** Espetros ESI(+)-TOF-MS no intervalo de m/z entre 100 e 320 em que a) solução padrão de CIT, b) solução de CIT não submetida a radiação solar (controle de temperatura) e c) solução de CIT submetida a radiação durante 50 h e borbulhada com O₂. 54

| | |
|--|----|
| Figura 4.16: Espectros ESI(+)-TOF-MS no intervalo de m/z entre 330 e 500 em que a) solução padrão de CIT, b) solução de CIT não submetida a radiação solar (controle de temperatura) e c) solução de CIT submetida a radiação durante 50 h e borbulhada com O ₂ . | 55 |
| Figura 4.17: Esquema proposto para as vias de degradação do citalopram e respectivas estruturas. | 57 |
| Figura 4.18: Esquema resumo das vias de fragmentação do ião com m/z 339. | 58 |
| Figura 4.19: Esquemas resumo das vias de fragmentação dos iões com m/z 341. | 59 |
| Figura 4.20: Esquema resumo das vias de fragmentação do ião com m/z 355. | 60 |
| Figura 4.21: Esquema resumo das vias de fragmentação do ião com m/z 371. | 61 |
| Figura 4.22: Cromatograma obtido por HPLC-MS para a solução liofilizada de CIT 5 mg L ⁻¹ borbulhada com O ₂ durante 50h. | 61 |

Lista de tabelas

Capítulo 2- Fármacos no ambiente

| | |
|---|----|
| Tabela 2.1: Propriedades físico-químicas do citalopram. | 11 |
| Tabela 2.2: Exemplos de estudos sobre toxicidade aguda de alguns fármacos da classe ISRSs (Brausch et al. 2012). | 13 |
| Tabela 2.3: Concentrações de citalopram em diferentes ambientes aquáticos. | 15 |
| Tabela 2.4: Propriedades físico-químicas do diclofenac. | 17 |
| Tabela 2.5: Exemplos de dados sobre toxicidade aguda de alguns fármacos da classe AINEs (Brausch et al. 2012). | 19 |
| Tabela 2.6: Concentrações do diclofenac detetadas em diversos ambientes aquáticos. | 21 |
| Tabela 2.7: A porfirina tetracatiónica usada no estudo. | 28 |

Capítulo 4- Tratamento e discussão dos resultados

| | |
|--|----|
| Tabela 4.1: O coeficiente de correlação (r^2), a constante de velocidade (k) e o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) do citalopram (CIT) e diclofenac (DCF) obtidos através do ajuste dos resultados a uma cinética de pseudo-1ª ordem. O n representa o número de pontos utilizados na regressão e s o desvio padrão. | 48 |
| Tabela 4.2: Vias de fragmentação do citalopram: massa molecular (M_w), iões detetados em ESI(+)MS e iões fragmento detetados em ESI(+)MS ⁿ . Os iões fragmento principais estão apresentados, assim como a respetiva abundância relativa e perdas associadas. | 53 |
| Tabela 4.3: Dados de espetrometria de massa para a identificação dos produtos de fotodegração do citalopram: massa molecular (M_w), iões detetados em ESI(+)MS e iões fragmento detetados em ESI(+)MS ⁿ . Os principais iões fragmento foram apresentados, assim como a respetiva abundância relativa. | 56 |

Glossário

| | |
|------------------------|---|
| ACE | Aceclofenac |
| ADTs | Antidepressivos Tricíclicos |
| AINEs | Anti-Inflamatórios Não Esteróides |
| CIT | Citalopram |
| DCF | Diclofenac |
| DDD | Dose Diária Definida |
| EC₅₀ | A concentração do fármaco que induz metade do seu efeito máximo |
| ETARs | Estação de Tratamento de Águas Residuais |
| FLU | Fluoxetina |
| FLX | Fluvoxamina |
| GWRC | <i>Global Water Research Coalition</i> |
| HPLC | Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês <i>High-Performance Liquid Chromatography</i>) |
| IMAOs | Inibidores da Monoaminoxidase |
| IRSNs | Inibidores Seletivos de Recaptação de Serotonina-Noradrenalina |
| ISRSs | Inibidores Seletivos de Recaptação de Serotonina |
| IUPAC | União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>) |
| KTP | Cetoprofeno |
| KTR | Cetorolac |
| LC₅₀ | Concentração que resulta na morte de 50% da população em teste (do inglês <i>Lethal Concentration</i>) |
| LOEC | Menor concentração com efeito observável (do inglês <i>Lowest Observed Effect Concentration</i>) |
| LPME | Microextração em Fase Líquida (do inglês <i>Liquid Phase MicroExtraction</i>) |
| NAX | Naproxeno |
| OECD | Organização para a cooperação e desenvolvimento económico (do inglês <i>Organization for Economic Cooperation and Development</i>) |
| PAR | Paroxetina |
| ROS | Espécies reativas de oxigénio (do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i>) |
| SAC | Ácido alicílico |
| SER | Sertralina |
| SPE | Extração em fase sólida (do inglês <i>Solid Phase Extraction</i>) |
| λ | Comprimento de onda |
| λ_{max} | Comprimento de onda para o máximo de absorvência |

1. Introdução

1.1. Considerações gerais

A expansão industrial e o elevado crescimento populacional levaram ao consequente aumento da poluição atmosférica, aquática e dos solos. Devido à importância da água no nosso planeta, o estudo das fontes de contaminação deste recurso tem gerado um nível de preocupação crescente (Melo et al. 2009).

Para além dos inúmeros contaminantes gerados antropicamente, o termo contaminantes emergentes, tem surgido pública e repetidamente na última década. Na gama destes contaminantes, podemos nomear os **fármacos**, os produtos de higiene pessoal, as hormonas esteróides e, mais recentemente, as drogas ilícitas. Estas drogas foram colocadas no grupo de contaminantes emergentes do meio aquático com propriedades psicoativas potentes com efeitos desconhecidos nos seres aquáticos (V. Calisto and Esteves 2009; Clara et al. 2005; Evgenidou, Konstantinou, and Lambropoulou 2015; Jelic et al. 2011). No presente trabalho, os fármacos são o principal alvo em estudo.

Apesar de esta problemática ter sido identificada por volta dos anos 70 (Hignite and Azarnoff 1977), foi apenas em meados dos anos 90 que o conhecimento acerca da contaminação ambiental com fármacos cresceu (Santos et al. 2010). A evolução de técnicas analíticas, que até então não estavam suficientemente desenvolvidas, é apontada como um dos motivos deste progresso notório, sendo possível a deteção de compostos a níveis bastante baixos (variando dos ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$ em águas de superfície e efluentes e ng Kg^{-1} a $\mu\text{g Kg}^{-1}$ em solos e sedimentos) (Brausch et al. 2012; V. Calisto and Esteves 2009; Sanderson 2003). O facto destes compostos estarem presentes em "baixas concentrações" e a sua diversidade elevada, para além de complicar a deteção e análise nas matrizes aquáticas, também dificulta o processo de tratamento nas Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETARs) (Luo et al. 2014).

Várias vertentes deste tema foram analisadas pelos investigadores, nomeadamente ocorrência, destino, efeitos e métodos de remoção eficazes de compostos farmacêuticos no ambiente aquático (Behera et al. 2011; Fatta-Kassinos, Meric, and Nikolaou 2011; Li 2014; Santos et al. 2010).

Os fármacos podem sofrer mudanças estruturais decorrentes do processo metabólico, sendo excretados, pelos humanos ou pelos animais, gerando metabolitos (Rúa-Gómez and Püttmann 2013; Yuan et al. 2015). A metabolização raramente é completa e, dependendo dos fármacos, podem ser metabolizados em cerca de 95%, enquanto outros apenas em 5% (V. M. A. Calisto 2011). Existem ainda estudos que reportam que alguns fármacos, como os agentes de contraste, são excretados completamente inalterados (Joss et al. 2006). Após serem libertados para o ambiente, os compostos originais e/ou os seus metabolitos podem sofrer modificação química devido a transformações bióticas (de alguns organismos como bactérias ou fungos) ou processos abióticos (luz e hidrólise) (Rúa-Gómez and Püttmann 2013).

Os tratamentos efetuados nas ETARs têm sido apontados como ineficazes, de acordo com vários trabalhos publicados, sendo os efluentes tratados, mas ainda contaminados, reconhecidos como a principal forma de entrada destes compostos no ambiente. Assim, torna-se evidente a necessidade de melhorar a compreensão do comportamento destes compostos quando libertados para o ambiente aquático e o desenvolvimento de alternativas economicamente viáveis e satisfatórias no tratamento destas águas (Gao et al. 2012; Luo et al. 2014; Yuan et al. 2015).

2. *Revisão da literatura*

2.1. *Fármacos no ambiente*

Durante muitos anos, a produção e o consumo generalizado de fármacos para uso na medicina humana ou em medicina veterinária, resultaram num nível elevado de poluição dos recursos aquáticos (Homem and Santos 2011). O rápido desenvolvimento económico, condições de vida notoriamente melhoradas e o aumento da esperança média de vida, formam um conjunto de fatores que contribuíram para o aumento populacional, particularmente da população idosa e, conseqüentemente, o aumento de produção e consumo de fármacos. Atualmente, existem cerca de 4000 princípios ativos diferentes no mercado mundial (Rosi-Marshall and Royer 2012).

Apesar de, nos últimos anos, a publicação de trabalhos com fármacos no meio aquático ter aumentado exponencialmente, a complexidade deste *cocktail* de compostos dificulta a previsão do seu comportamento (Boreen, Arnold, and McNeill 2003; Kümmerer 2009). Na vasta gama de fármacos (medicamentos prescritos e não prescritos) detetados no ambiente, encontram-se antibióticos, antidepressivos, ansiolíticos, anti-epiléticos, sedativos, contraceptivos, reguladores de lípidos do sangue, β -bloqueadores, anti-inflamatórios, entre outros (V. Calisto and Esteves 2009; Lee, Peart, and Svoboda 2005; Rosal et al. 2010). Atualmente, existem inúmeros estudos que reportam a sua presença por todo o mundo (Behera et al. 2011; Boreen, Arnold, and McNeill 2003; Bu et al. 2013; Lindberg et al. 2014; Vasskog et al. 2008).

De acordo com o estudo efetuado por Runnalls et al., aproximadamente 150 compostos farmacêuticos foram detetados em diferentes matrizes, como por exemplo águas subterrâneas, águas de consumo, entre outras (Runnalls et al. 2010). A elevada polaridade e baixa volatilidade da maioria dos compostos farmacêuticos aumenta a probabilidade de estes se encontrarem nas águas de superfície se não forem eficientemente eliminados nas ETARs (Brausch et al. 2012). Os fármacos são produzidos para serem relativamente persistentes de forma a manterem-se ativos e exercerem a sua função terapêutica mesmo depois de passarem pelo trato digestivo; contudo, a nível de impacto ecológico as consequências desta persistência não são ainda completamente conhecidas (V.

M. A. Calisto 2011; Fatta-Kassinos, Meric, and Nikolaou 2011), sendo assim fundamentada a importância do trabalho proposto.

A presença destes contaminantes tem gerado efeitos adversos no ecossistema aquático, tais como toxicidade crónica e aguda, ou desenvolvimento de microrganismos resistentes aos compostos farmacêuticos (antibióticos). Esta preocupação está diretamente relacionada com o seu uso e descarga em grandes quantidades para o ambiente (V. M. A. Calisto 2011; Fick et al. 2009; Kümmerer 2001; Luo et al. 2014; Rosal et al. 2010). Alguns estudos ecotoxicológicos demonstraram a toxicidade crónica para os organismos aquáticos devido à constante exposição a estes contaminantes mesmo em doses mínimas (González Alonso et al. 2010; Rúa-Gómez and Püttmann 2013). A feminização dos peixes é um exemplo de graves alterações devidas à presença destes contaminantes, podendo provocar, em casos extremos, a extinção da espécie (Lee, Peart, and Svoboda 2005). Outro tópico a ter em consideração é o facto destes contaminantes estarem presentes como misturas quando detetados, por exemplo, em matrizes aquáticas. Um estudo feito com algas registou comportamentos diferentes quando submetidas a uma mistura de fármacos ou quando submetidas a compostos isolados (Rosi-Marshall and Royer 2012). Como já foi dito anteriormente, apesar dos diversos estudos feitos para uma melhor compreensão dos efeitos ambientais potencialmente exercidos pelos fármacos, este tópico está longe da sua conclusão. Alguns autores afirmam que cerca de 10-15% dos fármacos encontrados nas águas de superfície, quando testados com espécies aquáticas padronizadas, são aguda ou cronicamente tóxicos (Brausch et al. 2012).

2.2. Fontes de contaminação e métodos de tratamento

Uma vez que os fármacos podem entrar no ambiente sob a sua forma original ou na dos seus metabolitos, é possível identificar estes contaminantes em amostras provenientes de diversas fontes como, por exemplo, em águas de superfície, águas subterrâneas, águas de consumo, esgotos, lamas, solos e sedimentos (Fatta-Kassinos, Meric, and Nikolaou 2011; Lin and Tsai 2009; Vasskog et al. 2008). Existem várias vias de entrada de fármacos no ambiente, sendo a mais relevante a excreção dos fármacos pela urina e pelas fezes dos pacientes (proveniente de medicina humana ou veterinária) que chegam às ETARs através dos efluentes domésticos ou hospitalares (Kümmerer 2009; Vasskog et al. 2008).

Além desta fonte existem também outras que contribuem para a contaminação do ambiente, tais como a eliminação incorreta de fármacos não utilizados (por exemplo, medicamentos inutilizados ou fora de validade que são frequentemente descartados pelo autoclismo ou no lixo comum), que são depositados em aterros sanitários ou que têm como destino as ETARs. As lamas destas instalações são também utilizadas como fertilizantes na agricultura podendo contaminar as águas subterrâneas e os solos (Kümmerer 2009; Santos et al. 2010). Na figura 2.1 são mostradas algumas formas de entrada destes fármacos no ambiente.

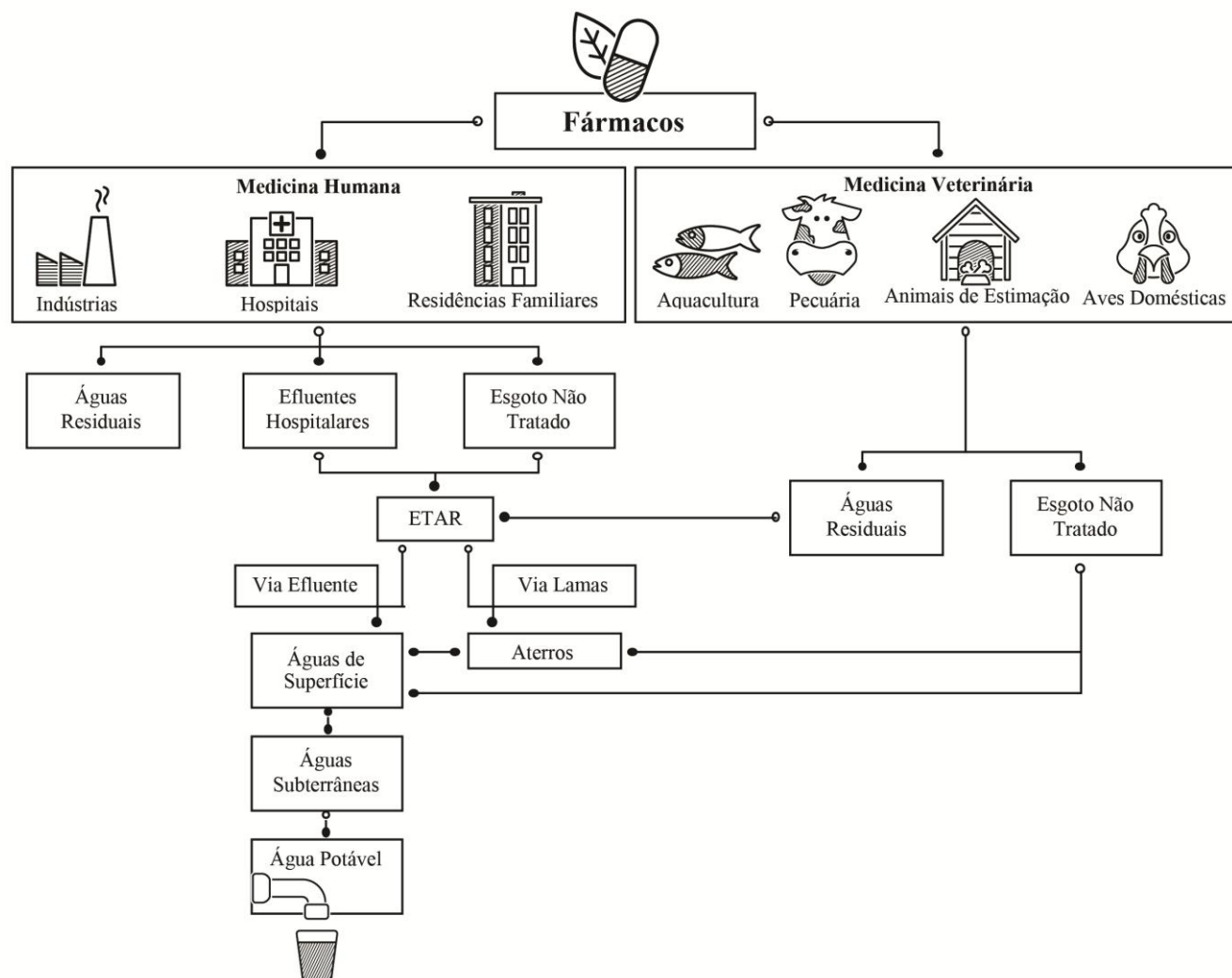


Figura 2.1: Diferentes formas de entrada de fármacos no ambiente.

O facto de diversos fármacos possuírem carácter hidrofílico e serem substâncias polares, pode aumentar a possibilidade de passagem destes compostos no processo de purificação das águas, podendo assim chegar ao ambiente (Pérez and Barceló 2007; Rodil et al. 2012). As estações de tratamento não foram desenhadas especificamente para a eliminação de fármacos, utilizam métodos de tratamento baseados na biodegradação, adsorção a lamas, filtração e oxidação (Homem and Santos 2011; Silva et al. 2012; Y. Zhang, Geissen, and Gal 2008). Apesar de alguns compostos farmacêuticos serem eliminados com estes tratamentos, a eficiência depende do sistema de tratamento (biológico ou químico) e da tecnologia utilizada em cada estação (Pérez and Barceló 2007; Silva et al. 2012). No caso particular dos fármacos psiquiátricos a eficiência de remoção de tratamento geralmente é inferior a 10% (V. Calisto et al. 2011). Naturalmente que esta eficiência depende também da natureza de cada fármaco a ser removido (por exemplo, da sua solubilidade, polaridade, adsorção e biodegradabilidade) e de condições ambientais como a temperatura e intensidade da radiação solar, por exemplo (Lin, Yu, and Lateef 2009).

Wang e seus colaboradores mostraram que, no caso de alguns compostos farmacêuticos em amostras retiradas no verão e no inverno, a ocorrência destes era menor e maior, respetivamente. No verão, a subida de temperatura das águas, o aumento da radiação solar e o incremento da atividade bacteriana promovem a degradação destes compostos e, portanto, a diminuição da sua ocorrência (Wang et al. 2011).

Resumidamente, no normal funcionamento de uma ETAR a eficiência da eliminação dos referidos contaminantes emergentes depende de certas condições operacionais e ambientais geradas nestas estações. Relativamente às condições operacionais, o tempo de retenção hidráulico, o tempo de retenção das lamas e a cinética de biodegradação são parâmetros muito importantes a serem considerados. As condições ambientais resumem-se a eficiências diminuídas com temperaturas baixas (dependendo da época sazonal), a cinética de degradação é influenciada pelo pH do meio e condições redox (diferentes eficiências foram reportadas quando o meio era aeróbico ou anaeróbico) (Evgenidou, Konstantinou, and Lambropoulou 2015).

2.3. Fármacos em estudo

2.3.1. Antidepressivos

Atualmente, como consequência de várias desordens psiquiátricas e a crescente consciencialização de problemas relacionados com a mente, a prescrição de fármacos psiquiátricos tem crescido dramaticamente, particularmente os antidepressivos (Kosjek and Heath 2010; Silva et al. 2012). Alguns estudos defendem que, por volta de 2020, a depressão será considerada a segunda doença mais grave de todo o mundo (Lajeunesse, Gagnon, and Sauvé 2008).

No caso específico de Portugal, atualmente, o consumo de antidepressivos é o segundo mais elevado de toda a Europa (sendo liderado pela Islândia). Conforme dados estatísticos da OECD (do inglês Organization for Economic Co-operation and Development), houve um aumento de cerca de 20% de 2009 para 2011, dados que têm sido justificados com a crise económica na Europa. Mais recentemente, esta organização publicou dados atualizados (OECD, 2015), verificando-se novamente o consumo crescente destes fármacos. Na figura 2.2 estão representados os estudos efetuados pela OECD relativamente ao consumo global de antidepressivos (comparação de 2011 e 2013), sendo estes representados pela unidade de medida estatística DDD (Dose Diária Definida, do inglês, *Defined Daily Dose*) por 1000 habitantes por dia. A DDD é uma das medidas para quantificar o uso de medicamentos e é definida como a média diária de ingestão de determinada substância ativa na sua principal indicação terapêutica, em adultos. Esta unidade representa uma unidade técnica e não reflete necessariamente a dose diária recomendada ou prescrita (Infarmed, 2015; OECD, 2011; OECD, 2015).

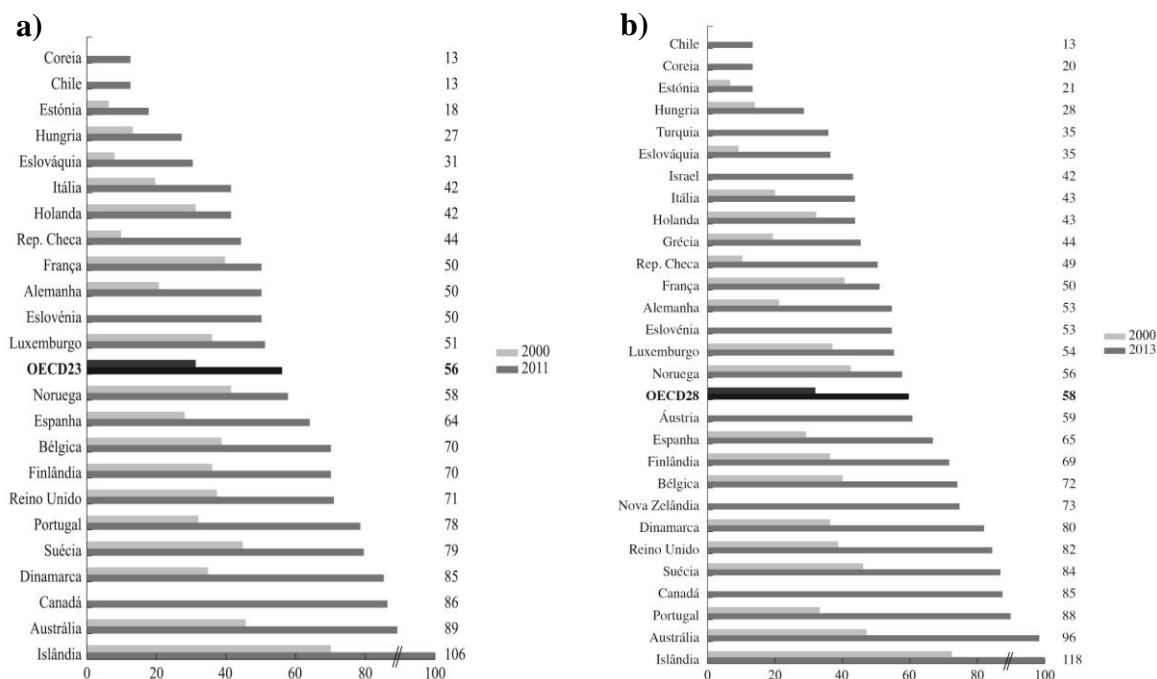


Figura 2.2: a) Consumo global de antidepressivos, DDD/1000 habitantes/dia (OECD, 2011) e b) Consumo global de antidepressivos, DDD/1000 habitantes/dia (OECD, 2015).

Os antidepressivos podem ser classificados em quatro classes de acordo com a sua estrutura e o seu modo de atuação (Santoke et al. 2012; Silva et al. 2012):

- Inibidores da monoaminoxidase (IMAOs);
- Antidepressivos tricíclicos (ADTs);
- Inibidores seletivos de recaptção de serotonina-noradrenalina (IRSNs);
- **Inibidores seletivos de recaptção de serotonina (ISRSs).**

A primeira escolha para o tratamento de doenças relacionadas com a mente têm sido os ISRSs. As vantagens relacionadas com a utilização desta classe de antidepressivos passam pela redução dos efeitos secundários mantendo a sua eficácia quando comparados com antidepressivos clássicos (H. Jones, Voulvoulis, and Lester 2005). Presentes no mercado desde meados dos anos 80, estes fármacos são utilizados no tratamento da depressão, no tratamento de desordens obsessivas-compulsivas, fobia social, défice de atenção/hiperatividade e ataques de pânico (Kosjek and Heath 2010; Silva et al. 2012). A

sua forma de atuar centra-se na inibição da recaptação de serotonina que potencia a neurotransmissão de serotonina (Macek, Ptáček, and Klíma 2001).

Os fármacos como o **citalopram (CIT)**, paroxetina (PAR), sertralina (SER), fluvoxamina (FLX) e fluoxetina (FLU) pertencem a esta classe de antidepressivos (na figura que se segue estão representadas as respetivas estruturas químicas).

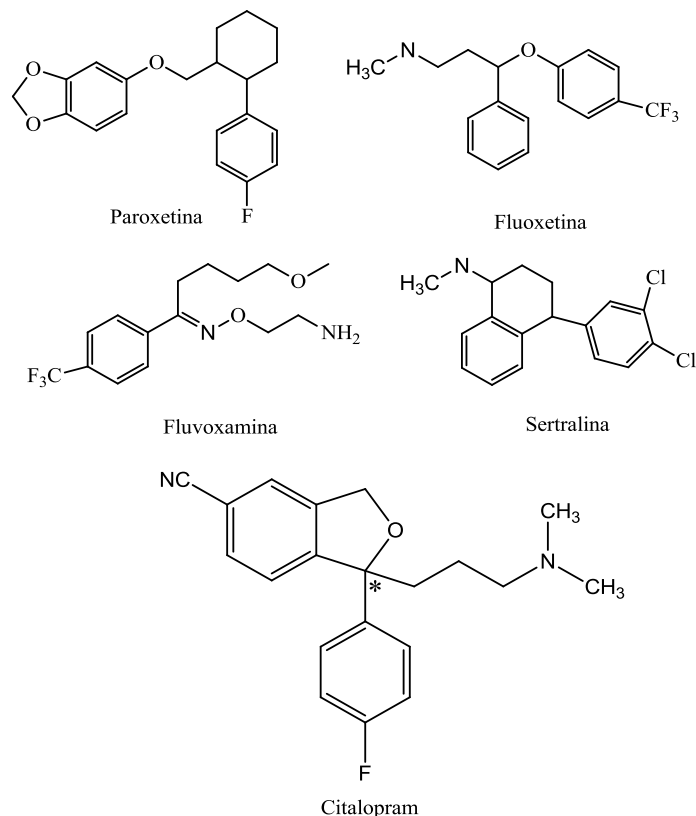


Figura 2.3: Estruturas químicas dos compostos pertencentes à classe ISRSs.

O citalopram é distinguido como o antidepressivo de eleição da sua classe. Este composto é uma mistura racémica e é vendido tanto como mistura racémica como apenas na forma do enantiómero S conhecido como escitalopram (Kwon and Armbrust 2005; Macek, Ptáček, and Klíma 2001). O efeito farmacológico da mistura racémica do citalopram reside maioritariamente no escitalopram, sendo o enantiómero R considerado inativo (Brøsen and Naranjo 2001). Relativamente à sua estrutura química, a presença do grupo nitrilo, do anel tetra-hidrofurano e da ligação C-N em cadeia na estrutura torna este composto propício a degradação devido à reatividade destes grupos em meios oxidativos, hidrolíticos ou fotocatalíticos (Sharma et al. 2011).

As propriedades físico-químicas deste composto são apresentadas na tabela 2.1.

Tabela 2.1: Propriedades físico-químicas do citalopram.

| | Citalopram | Referências |
|---|---|-----------------------------|
| Nome IUPAC | Hidrobrometo de 1-[3-(dimetilamino)propil]-1-(4-fluorofenil)-1,3-di-hidroisobenzofurano-5-carbonitrilo | Sigma-Aldrich |
| Nº CAS | 59729-32-7 | Sigma-Aldrich |
| Fórmula Molecular | $C_{20}H_{21}FN_2O.HBr$ | Sigma-Aldrich |
| Massa Molecular (g mol ⁻¹) | 405,3 | Sigma-Aldrich |
| pKa | 9,59 | Vasskog et al. 2006 |
| λ_{max} (nm) | 240 | Kwon and Armbrust 2005 |
| Solubilidade em água a 25°C (mg mL ⁻¹) | 4 | Silva et al. 2012 |
| Metabólitos maioritários | Desmetilcitalopram (DCIT), didesmetilcitalopram (DDCIT), <i>N</i> -óxido do citalopram (CIT- <i>N</i> -óxido) e derivado do ácido propanóico (CIT-PROP) | V. Calisto and Esteves 2009 |

O citalopram é administrado por via oral e metabolizado maioritariamente no fígado. Este fármaco apresenta uma cinética linear quando administrado num intervalo de 10 a 60 mg por dia e atinge concentrações plasmáticas máximas entre 2 a 4 horas após a toma. O tempo de meia vida de eliminação deste fármaco pode variar de 23 a 45 horas (Unceta, Goicolea, and Barrio 2011). Como é indicado na tabela 2.1, os metabólitos maioritários são o DCIT e DDCIT que se originam pela *N*-desmetilação do citalopram;

através da *N*-oxidação origina-se o CIT-*N*-óxido; através da desaminação oxidativa origina-se um derivado do ácido propanóico, o CIT-PROP. Na figura 2.4 observam-se as estruturas químicas dos metabolitos maioritários conhecidos do citalopram (Kwon and Armbrust 2005; Unceta, Goicolea, and Barrio 2011).

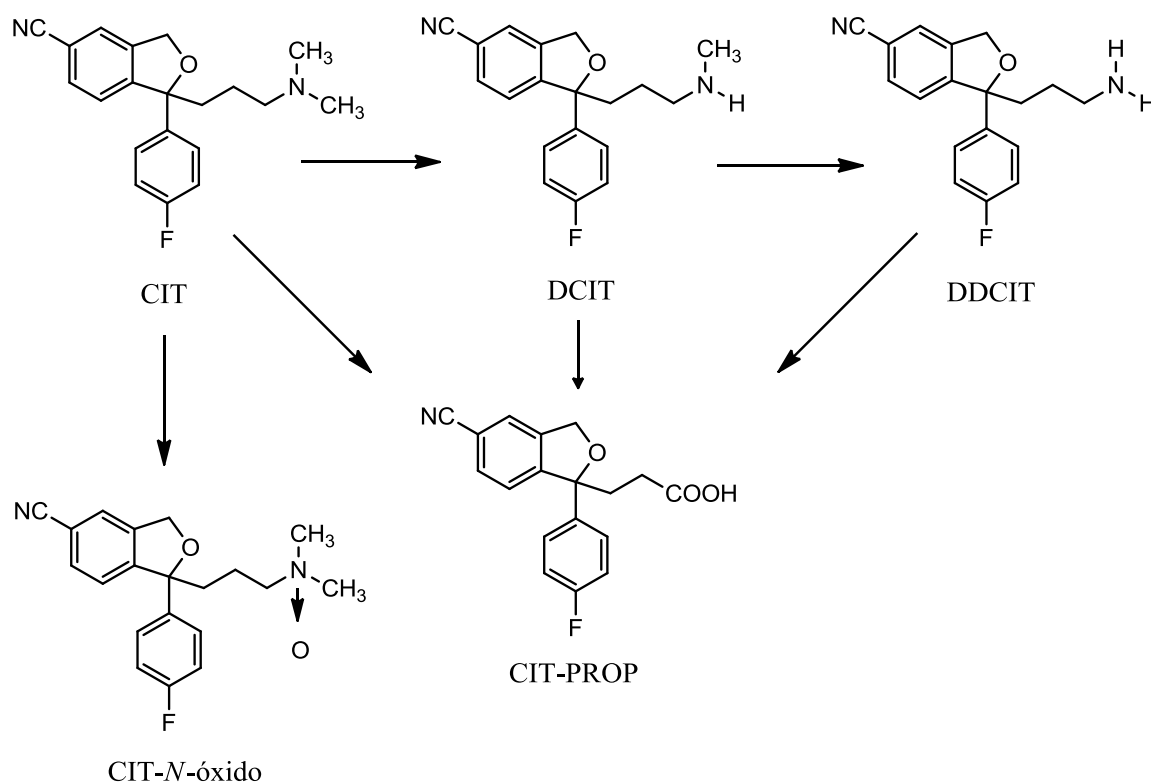


Figura 2.4: Metabolismo hepático do citalopram (Unceta, Goicolea, and Barrio 2011).

Durante muito tempo, a comunidade científica salientou a importância do estudo dos potenciais efeitos adversos dos esteróides ou de outros estrogénios, devido ao seu modo de atuação no organismo humano. Estes têm a capacidade de interferir nas respostas endócrinas dos organismos aquáticos assim como os antidepressivos, podendo interferir na reprodução destas espécies (Brooks et al. 2003; V. M. A. Calisto 2011). No trabalho efetuado por Henry et al. a toxicidade aguda e crónica foi estudada sendo possível identificar as consequências, nos organismos não alvo, provocadas pela presença desta classe de compostos (ISRSs) no ambiente aquático. Esta investigação confirmou que a exposição da espécie invertebrada estudada, *Ceriodaphnia dubia*, na presença destes antidepressivos, diminui o número de neonatos e ninhadas por fêmea variando o LOEC (menor concentração com efeito observável do inglês *Lowest Observed Effect*

Concentration) de 0,045 mg L⁻¹ a 4 mg L⁻¹, no caso particular da sertralina ou do citalopram, respetivamente. O aumento da concentração destes compostos, provocou um aumento da mortalidade da espécie, variando os valores de LC₅₀ (concentração letal do inglês *Lethal Concentration*) de 0,12 mg L⁻¹ para a sertralina e de 3,90 mg L⁻¹ para o citalopram (Henry et al. 2004).

De salientar a revisão de literatura de Brausch e seus colaboradores, que discutem estudos de diversos autores (incluindo o estudo de Henry e seus colaboradores) em relação à toxicidade aguda de fármacos. Na tabela 2.2 encontram-se alguns destes estudos feitos para a classe ISRSs (Brausch et al. 2012).

Tabela 2.2: Exemplos de estudos sobre toxicidade aguda de alguns fármacos da classe ISRSs (Brausch et al. 2012).

| Composto | Espécie | Grupo trófico | Valor (mg L ⁻¹) | Duração |
|----------|-----------------------|---------------|-----------------------------|-------------------------|
| SER | <i>C. dubia</i> | Invertebrado | 0,12 | 48-h LC ₅₀ |
| | <i>D. magna</i> | Invertebrado | 0,92 | 48-h EC ₅₀ |
| | <i>P. subcapitata</i> | Algae | 0,04 | 48-h EC ₅₀ |
| FLX | <i>D. magna</i> | Invertebrado | 13 | 48-h EC ₅₀ |
| | <i>P. subcapitata</i> | Algae | 0,062 | 48-h EC ₅₀ |
| FLU | <i>C. dubia</i> | Invertebrado | 0,51 | 48-h LC ₅₀ |
| | <i>D. magna</i> | Invertebrado | 6,4 | 48-h EC ₅₀ |
| | <i>G. affinis</i> | Peixe | 0,55 | 7-dias LC ₅₀ |
| CIT | <i>C. dubia</i> | Invertebrado | 3,9 | 48-h LC ₅₀ |
| | <i>D. magna</i> | Invertebrado | 20 | 48-h EC ₅₀ |
| | <i>P. subcapitata</i> | Algae | 1,6 | 48-h EC ₅₀ |

Em geral, diversos estudos têm demonstrado que a classe ISRSs é a mais tóxica para organismos aquáticos de entre as diferentes classes de antidepressivos. Como se pode ver na tabela 2.2, são apresentados exemplos dos efeitos dos antidepressivos em organismos aquáticos. Nesta revisão, os autores identificaram a sertralina como o antidepressivo com toxicidade aguda mais elevada para os diferentes grupos tróficos estudados (Brausch et al. 2012; Henry et al. 2004).

Exemplos de ocorrências do citalopram no ambiente aquático em diversos países estão apresentados na tabela 2.3. No caso particular de Portugal, segundo um estudo

recente efetuado por Silva et al., em que foram estudados quatro antidepressivos da classe ISRSs, (fluoxetina, sertralina, paroxetina e o citalopram), o citalopram foi o fármaco detetado com maior frequência e em maiores concentrações nas 15 ETARs (distribuídas por todo o país) estudadas (Silva et al. 2014a). Em estudos realizados noutras regiões do mundo, os autores chegaram aos mesmos resultados, por exemplo no Canadá, na Noruega ou em Espanha (Gros, Rodríguez-Mozaz, and Barceló 2012; MacLeod, Sudhir, and Wong 2007; Vasskog et al. 2006). Este facto pode ser justificado por diversos fatores, como o seu consumo, excreção ou forma de tratamento, por exemplo. Segundo o Infarmed, em 2011 foram vendidas 666450 embalagens de citalopram e escitalopram em Portugal, tornando este fármaco o terceiro mais vendido da sua classe (Silva et al. 2014b).

Tabela 2.3: Concentrações de citalopram em diferentes ambientes aquáticos.

| | Tipo de amostra | Concentração (ng L⁻¹) | Preparação das amostras e métodos analíticos | País | Referências |
|-------------------|--------------------------|---|---|-------------|--|
| Citalopram | Efluente ETAR | 44-322 | SPE e CE | Áustria | Himmelsbach, Buchberger, and Klampfl 2006 |
| | Efluente ETAR | 207 | SPE e HPLC-MS/MS | Canadá | MacLeod, Sudhir, and Wong 2007 Lajeunesse, Gagnon, and Sauvé 2008 |
| | Afluente ETAR | 307 | | | |
| | Rio St. Laurence | 3,4-11,5 | SPE e LC-MS/MS | | |
| | Efluente ETAR | 430000 | SPE e LC-MS | Índia | Fick et al. 2009 |
| | Rios Isakavagu-Nakkavagu | 400-76000 | | | |
| | Água para consumo humano | 76-1400 | | | |
| | Água de superfície | 2000-8000 | | | |
| | Efluente ETAR | 21,9-238,4 | LPME e HPLC-MS/MS | Noruega | Vasskog et al. 2008 |
| | Afluente ETAR | 62,9-303,6 | | | |
| | Rio Guadarrama | 13-120 | SPE e HPLC-ZMD | Espanha | González Alonso et al. 2010 |
| | Rio Manzanares | 58 | | | |
| | Efluente ETAR | 86-223 | SPE e LC-MS | Canadá | Lajeunesse et al. 2012 |
| | Afluente ETAR | 136-326 | | | |
| | Efluente ETAR | 87 | SPE e LC-MS | Portugal | Silva et al. 2014a |
| | Afluente ETAR | 137 | | | |

2.3.2. Anti-inflamatórios não esteróides (AINEs)

Nas últimas décadas, os AINEs têm sido utilizados globalmente em elevadas doses devido à sua ação anti-inflamatória, antipirética e analgésica (Musa and Eriksson 2009; Villar Navarro et al. 2011). Estes fármacos são também utilizados para o tratamento de doenças inflamatórias cutâneas e doenças degenerativas dos músculos. Além de serem de fácil aplicação, estes fármacos garantem elevada concentração na área afetada com baixa absorção sistémica e os efeitos secundários são mínimos (Musa and Eriksson 2009).

Os fármacos mais consumidos pertencentes a esta classe são ibuprofeno (IBU), ácido salicílico (SAC), cetoprofeno (KTP), ceterolac (KTR), naproxeno (NAX), aceclofenac (ACE) e **diclofenac (DCF)**. Na figura 2.5 apresentam-se as estruturas químicas destes compostos. Neste trabalho, apenas o diclofenac vai ser alvo de estudo.

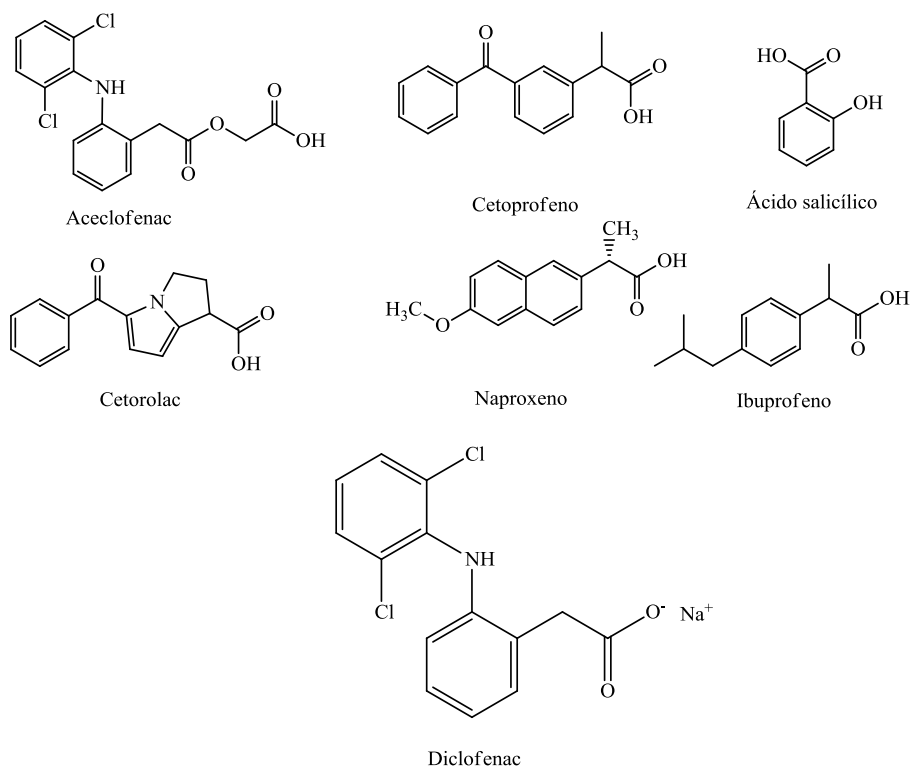


Figura 2.5: Estruturas químicas dos compostos pertencentes à classe AINEs.

O diclofenac, derivado do ácido fenilacético, foi introduzido em 1981 e é o mais popular dos fármacos da sua classe. A sua forma de atuar baseia-se na diminuição da permeabilidade capilar dos tecidos inflamados, na inibição da síntese das prostaglandinas e

agregação plaquetária. É prescrito para o tratamento de doenças como a osteoartrite, dismonorreia entre outras (Bartels and von Tümping 2007; Musa and Eriksson 2009; N. Zhang et al. 2011).

Na tabela seguinte encontram-se as propriedades físico-químicas deste composto.

Tabela 2.4: Propriedades físico-químicas do diclofenac.

| | Diclofenac | Referências |
|---|---|---------------------------------------|
| Nome IUPAC | 2-(2-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil) acetato de sódio | Verenitch, Lowe, and Mazumder 2006 |
| Nº CAS | 15307-79-6 | Sigma-Aldrich |
| Fórmula Molecular | C ₁₄ H ₁₀ Cl ₂ NNaO ₂ | Sigma-Aldrich |
| Massa molecular (g mol ⁻¹) | 318,13 | Sigma-Aldrich |
| pKa | 4,15 | Y. Zhang, Geissen, and Gal 2008 |
| λ_{max} (nm) | 276 | N. Zhang et al. 2011 |
| Solubilidade em água a 25°C (mg mL ⁻¹) | 23,73 | Y. Zhang, Geissen, and Gal 2008 |
| Metabolitos maioritários | 4'-hidroxiclofenac e 5'-hidroxiclofenac | Y. Zhang, Geissen, and Gal 2008 |

O metabolismo oxidativo do diclofenac é catalisado por duas enzimas do citocromo P450 frequentemente denominadas por CYP3A4 e CYP2C9 que, por hidroxilação dos anéis aromáticos, dá origem aos produtos maioritários 5- e 4'-hidroxiclofenac, respetivamente (figura 2.6) (Bort et al. 1999; Grillo et al. 2008; Ngui et al. 2000).

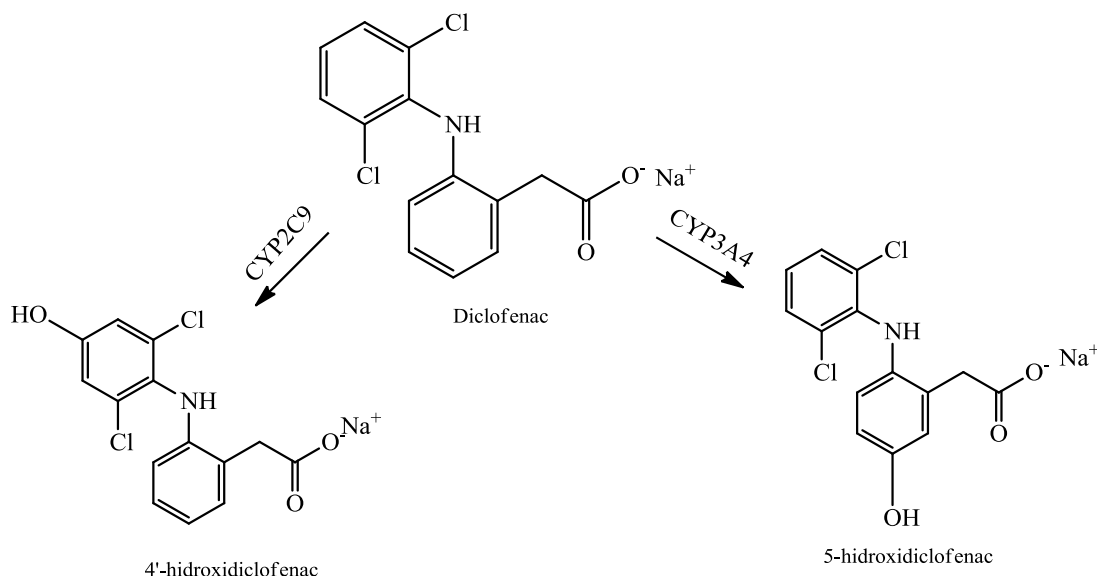


Figura 2.6: Metabolismo do diclofenac catalisado pelo citocromo P450 (Ngui et al. 2000).

Na literatura é possível encontrar alguns estudos das consequências da presença deste fármaco no ambiente. Brausch et al., discutiram alguns dados de diversos autores em relação à toxicidade aguda de fármacos, apresentando-se na tabela 2.5 alguns exemplos relativos à classe AINEs. Resumidamente, neste estudo foi possível ordenar os fármacos desta classe por toxicidade, sendo o mais tóxico o IBU (ibuprofeno) e o menos tóxico o SAC (ácido salicílico) (Brausch et al. 2012).

Tabela 2.5: Exemplos de dados sobre toxicidade aguda de alguns fármacos da classe AINEs (Brausch et al. 2012).

| Composto | Espécie | Grupo trófico | Valor (mg L ⁻¹) | Duração |
|----------|-----------------------|---------------|-----------------------------|-------------------------|
| SAC | <i>D. magna</i> | Invertebrado | 230 | 24-h EC ₅₀ |
| | <i>S. subspicatus</i> | Algae | >100 | 72-h EC ₅₀ |
| IBU | <i>D. magna</i> | Invertebrado | 108 | 48-h EC ₅₀ |
| | <i>D. subspicatus</i> | Algae | 315 | 72-h EC ₅₀ |
| | <i>O. latipes</i> | Peixe | >100 | 96-h LC ₅₀ |
| | <i>P. carinatus</i> | Molusco | 17 | 72-h LC ₅₀ |
| KTR | <i>L. macrochirus</i> | Peixe | 1480 | 96-h LC ₅₀ |
| DCF | <i>C. dubia</i> | Invertebrado | 22,7 | 48-h EC ₅₀ |
| | <i>D. subspicatus</i> | Algae | 72 | 3-dias EC ₅₀ |
| | <i>D. rerio</i> | Peixe | 7,8 | 72-h LC ₅₀ |
| | <i>T. battagliai</i> | Invertebrado | 15,8 | 48-h LC ₅₀ |
| | <i>S. costatum</i> | Algae | 5 | 72-h LC ₅₀ |

Relativamente ao fármaco em estudo, o diclofenac, para além dos exemplos referidos na tabela 2.5, foi confirmado que este pode também causar alterações nas guelras da truta arco-íris. Nesta espécie de trutas, a exposição a este fármaco durante 28 dias veio a demonstrar lesões renais e alterações nas guelras desta espécie com LOEC de 5 µg L⁻¹ (Schwaiger et al. 2004; N. Zhang et al. 2011).

Desde meados dos anos 90 que os abutres da espécie *gyps indicus*, têm diminuído drasticamente, com estudos a indicarem um declínio da espécie em mais de 90%, sendo o diclofenac apontado como principal responsável por este acontecimento. Sendo este largamente administrado em animais de quinta, os abutres estão diretamente expostos a este fármaco ao comerem as carcaças destes animais. O diclofenac provoca insuficiência renal nos abutres com concentrações abaixo dos 1 µg L⁻¹ (GREEN et al. 2006; Taggart et al. 2007; N. Zhang et al. 2011).

Baseados nos impactos ecotoxicológicos que demonstram as consequências da presença deste fármaco no ambiente, a organização *Global Water Research Coalition* (GWRC) divulgou um estudo que permite a ordenação dos compostos por ordem de risco associado à sua presença no ciclo da água. Segundo esta organização, o diclofenac está

inserido na classe I, sendo considerado assim como um fármaco de prioridade elevada (De Voogt et al. 2009), razão pela qual foi escolhido para o estudo da sua persistência.

Este composto tem sido detetado em efluentes das ETARs, em rios ou lagos, devido aos tratamentos ineficazes destas, sendo os níveis de remoção variáveis desde os 0 aos 80% (Musa and Eriksson 2009; N. Zhang et al. 2011). Na tabela 2.6 encontram-se alguns exemplos da presença deste fármaco em diversas matrizes aquáticas.

Tabela 2.6: Concentrações do diclofenac detetadas em diversos ambientes aquáticos.

| | Tipo de amostra | Concentração reportada (ng L ⁻¹) | Preparação de amostra e métodos analíticos | País | Referência |
|------------|-----------------------|--|--|----------|---|
| Diclofenac | Efluente ETAR | 230 | SPE e LC-(ESI)-MS/MS | Espanha | Rodil et al. 2012 |
| | Afluente ETAR | 200-3600 | | | Gómez et al. 2007 |
| | Efluente ETAR | 140-2200 | SPE e GC-SIM-MS | | |
| | Águas subterrâneas | 590 | SPE e GC-MS | Alemanha | Sacher et al. 2001 |
| | Rio Elber | 31-67 | SPE e GC-MS | | Weigel, Kallenborn, and Hühnerfuss 2004 |
| | Lago Alster | 26 | | | |
| | Efluente de Hospital | 328 | SPE e HPLC-MS/MS | Taiwan | Lin and Tsai 2009 |
| | Efluente ETAR | 4-101 | SPE e LC-(ESI)-MS | | Lin, Yu, and Lateef 2009 |
| | Afluente ETAR | 3-437 | | | |
| | Efluente ETAR | 32-448 | SPE e GC-MS/MS | Canadá | Verenitch, Lowe, and Mazumder 2006 |
| | Afluente ETAR | 50-2450 | SPE e GC-MS | | Lee, Peart, and Svoboda 2005 |
| | Efluente ETAR | 24 | SPE e LC-(ESI)-MS | Coreia | Behera et al. 2011 |
| | Afluente ETAR | 131 | | | |
| | Rio de Paraíba do Sul | 20-60 | SPE e GC-MS | Brasil | Stumpf et al. 1999 |
| | Oceano Atlântico | 241 | SPE e UHPLC-MS/MS | Portugal | Lolić et al. 2015 |

2.4. Processos de Fotodegradação no ambiente

Como mencionado anteriormente, os métodos convencionais de tratamento de águas não são adequados para a remoção da maioria dos compostos farmacêuticos. Neste contexto, é necessário o desenvolvimento de soluções práticas e económicas de forma a tentar minimizar a entrada contínua destes compostos no ambiente (Homem and Santos 2011).

Diversos estudos indicam diferentes processos de oxidação para a degradação de compostos farmacêuticos no ambiente aquático (Rosal et al. 2010). Quando os processos de biodegradação não são eficientes, a fotodegradação pode ser um fator crucial relativamente à persistência de fármacos no meio ambiente (Boreen, Arnold, and McNeill 2003). Uma vez que as ETARs normalmente operam num espaço aberto, que expõe a água a ser tratada diretamente à luz solar, torna-se assim evidente a importância do estudo dos processos de fotodegradação sob estas condições (Y. Zhang, Geissen, and Gal 2008).

A maioria dos compostos farmacêuticos contém heteroátomos, anéis aromáticos e outros grupos funcionais na sua estrutura, que podem absorver radiação solar ou podem reagir com espécies fotogeradas presentes nas águas como, por exemplo, espécies reativas de oxigénio ou matéria orgânica fotoexcitada (Boreen, Arnold, and McNeill 2003). Obviamente que a importância dos processos fotoquímicos está dependente da sensibilidade dos fármacos à luz (V. M. A. Calisto 2011). O espectro de absorção do composto alvo, o tipo de matriz e a intensidade da radiação, são também condições que afetam a fotólise (decomposição ou dissociação de compostos químicos pela luz solar, seja artificial ou natural) (V. M. A. Calisto 2011; Homem and Santos 2011).

Estes compostos podem ser transformados no ambiente aquático quando expostos à luz solar por:

- 1) Fotólise direta (um composto absorve radiação e ocorre uma transformação química);
- 2) Fotólise indireta (a luz inicia a reação noutras moléculas, por exemplo em matéria orgânica dissolvida, nitratos ou nitritos, originando espécies reativas que vão posteriormente reagir com os compostos) (Rúa-Gómez and Püttmann 2013).

2.4.1. Luz simulada versus luz natural

Os simuladores de radiação solar são frequentemente usados para reproduzir as condições de exposição à luz solar natural. A figura 2.7 ilustra o equipamento utilizado neste trabalho Solarbox 1500 (Co.fo.me.gra, Itália). Este simulador está equipado com uma lâmpada de arco xenon 1500 W e filtros UV que impedem a transmissão de comprimentos de onda abaixo dos 290 nm.



Figura 2.7: Solarbox utilizada para o desenvolvimento do estudo da fotodegradação do citalopram (Solarbox 1500, Co.fo.me.gra, Itália) equipado com sensor de UV, sensor de temperatura e um suporte de amostra.

Existem diversas variáveis que são difíceis de controlar, como por exemplo a reprodução exata do espectro solar. Na figura 2.8 está representado um real do sol e o espectro da lâmpada de arco xenon usada neste trabalho. Quando possível, a utilização de luz solar natural é sempre preferível; contudo, diversas vantagens na utilização de radiação solar simulada podem ser nomeadas: como a repetibilidade e reprodutibilidade do método, a possibilidade da execução de testes 24 horas em contínuo ou a possibilidade do controlo de temperatura. Apesar dos resultados obtidos pelos simuladores solares serem aceites, estes estão diretamente relacionados com as condições experimentais específicas em que foram obtidos, dificultando a comparação com outros estudos. Neste contexto, é pertinente a conversão dos parâmetros cinéticos obtidos para valores ambientalmente relevantes (V. M. A. Calisto 2011).

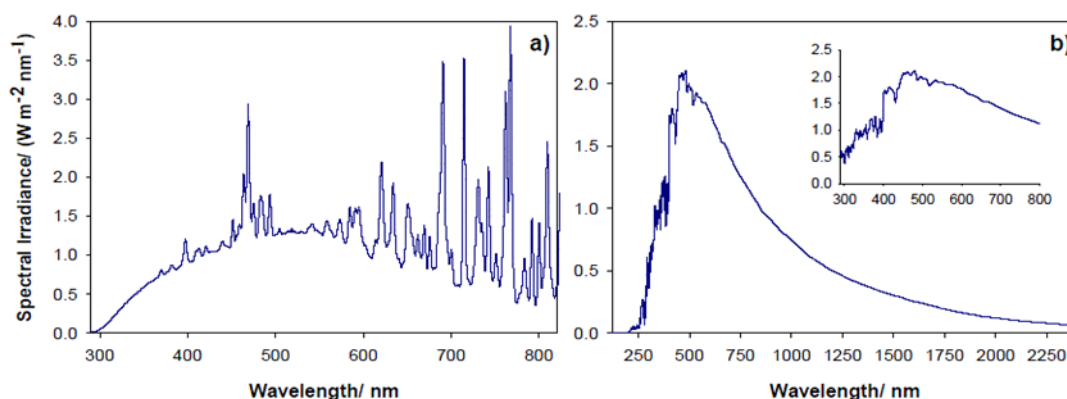


Figura 2.8: **a)** Espectro de irradiância de uma lâmpada arco xenon de 1500 W utilizando um filtro UV (outdoor) fornecido pelo fabricante (Solarbox 1500, Co.fo.me.gra, Itália). Este espectro é referido para uma irradiância de 550 W m^{-2} entre 290-800 nm. **b)** Espectro de irradiância do sol obtido pela fonte do projeto SOURCE (NASA, 2008). Este espectro refere-se ao dia 23 de Julho de 2008, e os valores foram médios por forma a fornecer a radiação solar (adaptado de V. M. A. Calisto 2011).

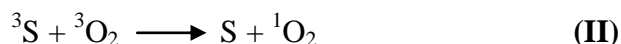
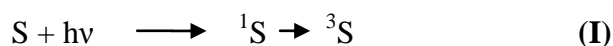
2.4.2. Fotossensibilizadores

A luz tem sido considerada, já há muito tempo, como terapia, quer seja utilizada isoladamente ou associada a um agente químico (com efeitos fotossensibilizadores). Por exemplo, na Índia, no tratamento de vitiligo (doença na pele), extratos de plantas contendo furocumarinas eram administrados por via oral seguido de exposição solar (Bonnett and Martinez 2001). Hoje em dia, e posteriormente ao sucesso de Finsen et al. no tratamento de *lupus vulgaris*, a luz tem sido uma ferramenta importante na medicina contemporânea. Desde então a terapia fotodinâmica tem sido utilizada no tratamento de diversas doenças, especialmente no tratamento do cancro (Bonnett and Martinez 2001).

Compostos fotossensibilizadores são utilizados nos estudos da biomedicina mas podem também ser aplicados na investigação de técnicas eficientes na destruição de poluentes (Herath et al. 2009; Rotomskis, Streckyte, and Bagdonas 1997). Diversos estudos demonstraram a degradação de inúmeros contaminantes orgânicos utilizando fotossensibilizadores. Estes compostos produzem espécies reativas de oxigénio (ROS) quando irradiados e que incluem o oxigénio singuleto ($^1\text{O}_2$), radicais hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) e aniões superóxido (O_2^-) (Josefsen and Boyle 2012; Lee, Peart, and Svoboda 2005). Estas

espécies, principalmente o $^1\text{O}_2$ e o $\cdot\text{OH}$, são altamente reativas com os poluentes existentes nas águas, sendo de especial interesse o seu estudo.

O processo de formação de oxigénio singuleto ($^1\text{O}_2$) é iniciado pela incidência de luz no sensibilizador (S) no estado fundamental promovendo-o para o seu primeiro estado excitado, e posteriormente, por cruzamento intersistemas, para o seu estado tripleto. Quando este sensibilizador transfere energia para uma molécula de oxigénio é produzido o oxigénio singuleto. Na presença de outras moléculas (M) em solução, estas podem sofrer oxidação pelo oxigénio singuleto precedentemente ao seu retorno ao estado fundamental (Bonnett and Martinez 2001; Changtong et al. 2013; Herath et al. 2009). Este processo é resumido de seguida.



Uma forma de estudo do efeito do oxigénio singuleto na fotodegradação de um composto é através da adição de agentes que desativam estas espécies reativas (Bancirova 2011). Neste trabalho, a azida de sódio foi utilizada como agente bloqueador da espécie de oxigénio singuleto, tratando-se de um agente bastante solúvel em água, demonstrando-se eficaz para este estudo.

2.4.2.1. *Porfirinas-macro ciclo porfirínico*

As porfirinas, cujo nome provém do grego *porphura* (roxo), são uma classe de pigmentos coloridos fluorescentes que podem ter origem natural ou sintética. Esta classe de compostos tem demonstrado as suas potencialidades perante a comunidade científica, sendo de especial interesse a nível terapêutico (Alves et al. 2009; DeRosa 2002).

Estes compostos são sistemas aromáticos, constituídos por vinte e dois eletrões π , em que apenas dezoito estão envolvidos na aromaticidade destes compostos. A conjugação destes eletrões fornece uma coloração intensa característica das porfirinas. Para além da sua

estrutura ser planar, as porfirinas obedecem à regra de Hückel ($4n+2$ eletrões π), facto que comprova a sua aromaticidade.

Uma das características mais relevantes destes compostos é o seu espectro na região da radiação visível. Este é constituído por uma banda de absorção a aproximadamente 400 nm, denominada banda Soret e por quatro bandas de absorção a comprimentos de onda maiores, as bandas Q, sendo as bandas Soret as mais intensas (figura 2.9).

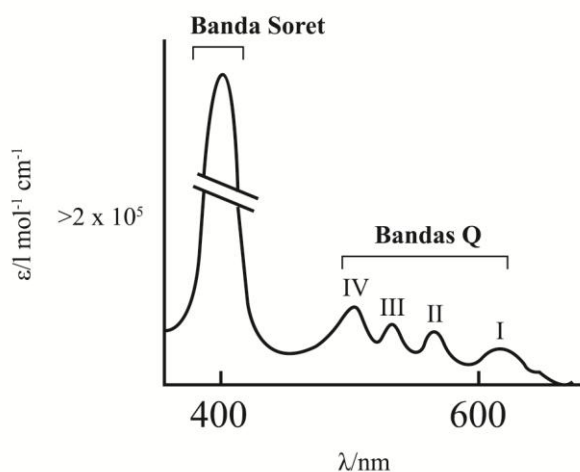


Figura 2.9: Espectro UV-VIS típico de uma porfirina.

O número de bandas Q, assim como a sua intensidade e posição no espectro é influenciado tanto pelos substituintes do anel como pelo metal que possuem. Com isto é possível referenciar que a complexação do anel geralmente aumenta a intensidade da banda Soret e reduz as bandas Q. Tratando-se de substituintes sacadores de eletrões, a posição das bandas é alterada normalmente para maiores comprimentos de onda (DeRosa 2002; J. Zhang et al. 2011).

Do ponto de vista reacional as porfirinas participam em reações de substituição aromática nucleofílica e electrofílica, reações de cicloadição e interconversão de grupos funcionais. Estas, onde se incluem metaloporfirinas, são reconhecidas como excelentes sensibilizadores. A sua utilização na fotocatalise tem um efeito bastante positivo, devido à sua elevada absorção principalmente na região de 400-450 nm e na região de 500-700 nm, e ainda pelo facto de na presença de eletrões- π possuírem as condições necessárias de transferência de eletrões durante as fotoreações (J. Zhang et al. 2011).

Algumas porfirinas podem também ativar o O_2 molecular e por este motivo podem ser utilizadas em reações oxidativas. A utilização de porfirinas como fotossensibilizadores

poderá ser considerada uma alternativa para o tratamento de águas associado ao problema de poluição com compostos farmacêuticos (Herath et al. 2009).

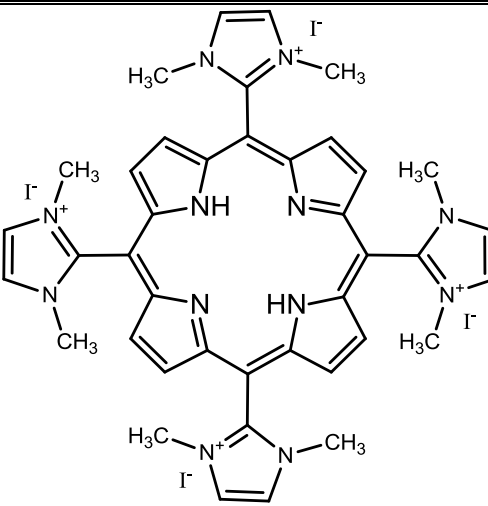
De seguida, apresentam-se exemplos de vantagens na utilização de porfirinas como fotossensibilizadores:

- Estabilidade aromática,
- Elevado rendimento quântico na produção de oxigénio singuleto,
- Aparente falta de toxicidade no escuro,
- Absorção na região infravermelha próxima (Bonnnett and Martinez 2001).

Aquando da utilização de porfirinas como fotossensibilizadores nas reações de fotodegradação, estão envolvidos dois tipos de mecanismos: o mecanismo do Tipo I e o mecanismo do Tipo II. Inicialmente, a porfirina absorve radiação e passa a um estado excitado e por conversão intersistemas, passa posteriormente a um estado excitado tripleto. No mecanismo do Tipo I, a porfirina excitada em estado tripleto pode reagir com o composto presente e formar os respetivos produtos de degradação; quanto ao mecanismo do Tipo II, a porfirina excitada em estado tripleto pode reagir com uma espécie no estado molecular, excitando-a e levando-a a reagir com o composto presente, promovendo a sua degradação.

Neste trabalho, a porfirina tetracatiónica $H_2TDMImP$, foi utilizada como fotossensibilizador para tentar aumentar a velocidade de fotodegradação do citalopram. Algumas características de porfirina são apresentadas na tabela que se segue.

Tabela 2.7: A porfirina tetracatiónica usada no estudo.

| Sensibilizador | Massa Molecular (g/mol) | Estrutura química |
|---|-------------------------|--|
| H₂TDMImP (C₄₀H₄₂N₁₂) | 690,84 |  |

2.5. Legislação

O tema dos fármacos no ambiente está cada vez mais presente perante a comunidade científica. Os vários estudos acerca deste assunto validam a importância desta problemática. A iniciativa SAICM (Strategic Approach to International Chemicals Management) promovida pelo programa das Nações Unidas para o ambiente tem como objetivo a listagem dos fármacos, nomeados como poluentes persistentes, como assunto prioritário. Na Diretiva 2008/105/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de dezembro de 2008 relativa a normas de qualidade ambiental no domínio da política da água, cujo artigo 8.º-B, nº1 prevê o estabelecimento de uma lista de vigilância para substâncias ou grupos de substâncias. Segundo esta Diretiva os fármacos como o **diclofenac**, 17 α -etinilestradiol (EE2) (usado nos contraceptivos orais) e o 17 β -estradiol (E2) (utilizado na terapia da substituição de hormonas), são colocados na lista de prioridade de estudo por forma a recolher dados que permitam facilitar a compreensão do risco destas substâncias. Para além destas substâncias, na decisão de execução 2015/495 de 20 de março de 2015, dados recolhidos em 2014 permitiram a introdução de novas substâncias na lista de vigilância prioritária, como por exemplo, quatro pesticidas neonicotinoides e o antibiótico da família dos macrólidos eritromicina (Comissão Europeia, 2015).

3. Materiais e métodos experimentais

3.1. Reagentes

Para a realização do trabalho laboratorial foram utilizados os seguintes reagentes: diclofenac sal de sódio (pureza: >98%) de Sigma-Aldrich; citalopram-HBr (pureza: >98%) de TCI; acetonitrilo (para HPLC, pureza $\geq 98\%$) de Prolabo; ácido acético (pureza: >98%) de Merck; azida de sódio (pureza: 99%) de Riedel-de Haën; porfirina H₂TDMImP (sintetizada e cedida pelo grupo de Química Orgânica da Universidade de Aveiro). Todas as soluções preparadas ao longo deste trabalho foram feitas com água Milli-Q (obtida por um sistema Milli-Q Millipore (Milli-Q plus 185)).

3.2. Lavagem do material de vidro

Ao longo do trabalho laboratorial, todo o material utilizado foi lavado com água e detergente, passado com água destilada repetidas vezes e submerso numa solução de detergente líquido alcalino Derquim L01 da Panreac a 2,5% durante pelo menos 12 horas. De seguida, este material foi passado nova e repetidamente por água destilada seguido de acetona.

3.3. Preparação de soluções aquosas

No estudo da fotodegradação do diclofenac e do citalopram, foram preparadas soluções padrão aquosas com concentrações finais de 10 mg L⁻¹ e de 5 mg L⁻¹, respetivamente.

Para o estudo cinético da influência da porfirina H₂TDMImP na fotodegradação do citalopram foram preparadas duas soluções desta porfirina. Uma com uma concentração final de 5 mg L⁻¹ de fármaco e 5 mg L⁻¹ de porfirina e outra com concentração final de citalopram de 5 mg L⁻¹ e 10 mg L⁻¹ de porfirina. Foi também preparada uma solução de citalopram, porfirina e azida de sódio de concentrações finais de 5 mg L⁻¹ de fármaco e porfirina e 4 mg L⁻¹ de azida de sódio, por forma a estudar a influência do oxigénio singuleto no mecanismo de degradação deste fármaco.

3.4. Instrumento de irradiação

Um simulador da luz solar Solarbox 1500 (Co.fo.me.gra, Itália) foi utilizado para a execução das irradiações ao longo deste trabalho. Este encontra-se equipado com uma lâmpada de arco de xenon de 1500 W e filtros que impedem a transmissão da luz a comprimentos de onda abaixo de 290 nm, um multímetro (Co.fo.me.gra, Itália) com um sensor de temperatura e um sensor de radiação 290-400 nm para a monitorização da temperatura e da irradiância, respetivamente.

3.4.1. Irradiação e preparação das amostras

Para proceder à irradiação de cada uma das soluções dos casos em estudo, foi utilizado um suporte metálico, com a capacidade para seis tubos de quartzo de 25 mL e de 1,5 cm de diâmetro. Após a preparação das soluções, foram transferidos aproximadamente 20 mL da solução em estudo para cada um dos tubos e as suas extremidades foram fechadas com várias camadas de parafilme para prevenir a evaporação das soluções durante a irradiação.

Previamente, três destes tubos foram revestidos com múltiplas camadas de papel de alumínio a que chamaremos controlos no escuro (figura 3.1). Dependendo da experiência em causa, e a intervalos de tempo predefinidos, foram retiradas alíquotas de 1 mL de cada tubo para posterior análise e foram armazenadas no escuro a 4°C. Em todas as experiências a irradiância foi mantida constante a 550 W m^{-2} .

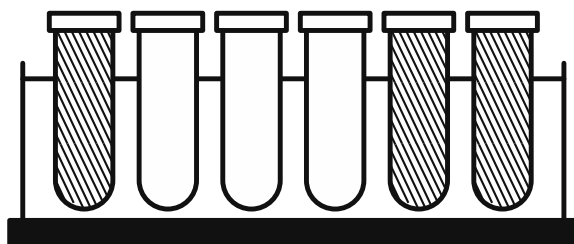


Figura 3.1: Sequência dos tubos de quartzo no interior da SolarBox (**controle 1**, tubos 1, 2 e 3 e **controle 2 e 3**, respetivamente).

3.5. Curva de calibração-Diclofenac

Foi preparada uma solução stock aquosa de diclofenac com concentração final de 20 mg L⁻¹. Com esta solução stock foram preparados seis padrões com concentrações entre 0,50 e 10 mg L⁻¹. Estas soluções foram todas envolvidas em papel de alumínio e armazenadas no frigorífico por forma a proteger da luz e prevenir a eventual degradação por ação da temperatura ambiente. A análise de cada padrão foi feita em triplicado por HPLC, como está descrito na secção 3.7.1.

3.6. Curva de calibração-Citalopram

Preparou-se uma solução stock aquosa de citalopram com concentração final de 120 mg L⁻¹ (1% de acetonitrilo (CH₃CN)). Com esta solução stock foram preparados sete padrões com concentrações entre 0,60 e 7,0 mg L⁻¹.

Estas soluções foram todas envolvidas em papel de alumínio e armazenadas no frigorífico por forma a proteger da luz e prevenir a eventual degradação por ação da temperatura ambiente. A análise de cada padrão foi feita em triplicado utilizando o método de HPLC descrito na secção 3.7.2.

3.7. Análise por Cromatografia Líquida de alta eficiência (HPLC) com detetor UV

Dependendo do fármaco a ser estudado, foram desenvolvidas metodologias analíticas por HPLC em equipamentos diferentes.

Para o **diclofenac**, foi utilizado um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência, Merck modelo L-6200A, constituído por duas bombas binárias, um desgaseificador, uma coluna C18 LICHrospher 100 RP (18,5 µm), um *loop* de 20 µL e um detetor UV-VIS L-4250. Na análise dos resultados das diversas irradiações do **citalopram** foi utilizado um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência, Shimadzu constituído por uma coluna-PFP ACE® C18 (5 µm) com dimensões 150 mm × 4.6 mm e um *loop* de 20 µL, um detetor UV-Vis SPD-20A, um forno CTO-10ASVP, uma bomba LC-20AD e um desgaseificador DGU-20A5. A temperatura da coluna foi mantida constante a 25°C.

3.7.1. Análise do diclofenac por HPLC

Para a análise do diclofenac o procedimento de análise foi adaptado de Neves et al. 2012 e N. Zhang et al. 2011.

Para a determinação do comprimento de onda adequado para a detecção do diclofenac, traçou-se um de absorvência para uma solução de 10 mg L^{-1} , entre 200 e 600 nm. Na figura seguinte apresenta-se o obtido para este composto.

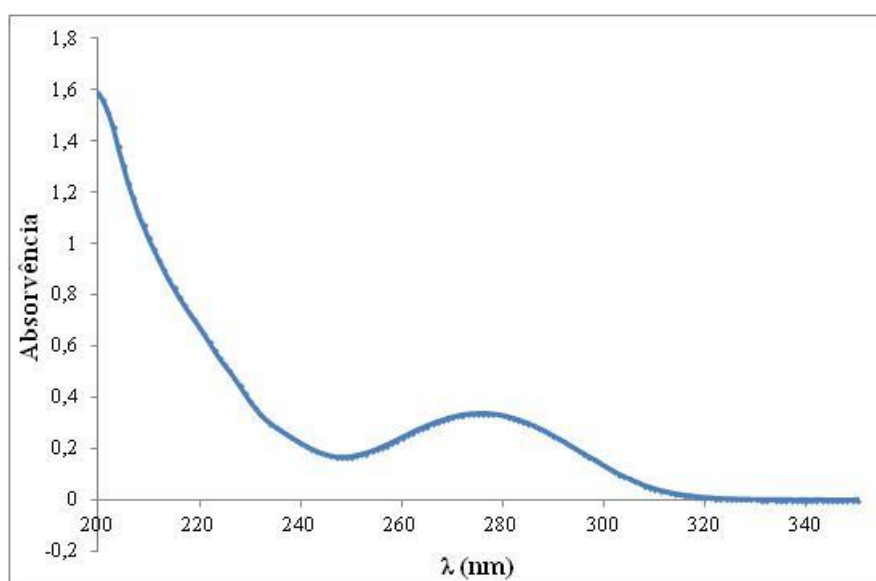


Figura 3.2: Espectro de UV-VIS para uma solução de diclofenac de 10 mg L^{-1} , obtido utilizando um espectrofotômetro Shimadzu usando uma célula com um percurso ótico de 1 cm.

Pela observação da figura 3.2 concluiu-se que existe um máximo local de absorvência ao comprimento de onda de aproximadamente 276 nm, tendo sido este o valor selecionado para a detecção deste composto ao longo do trabalho.

A eluição foi feita em gradiente utilizando (A) acetonitrilo e (B) uma solução aquosa de ácido acético (1% (v/v)) de acordo com o programa apresentado na figura 3.3, com um fluxo de $0,65 \text{ mL min}^{-1}$ o tempo total de análise foi de 50 minutos.

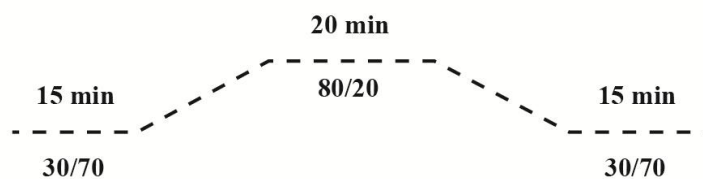


Figura 3.3: Representação gráfica do gradiente da fase móvel dos eluentes A/B.

3.7.2. *Análise do citalopram por HPLC*

Para a análise do citalopram, as condições de trabalho foram baseadas, com alterações, no trabalho dos autores Kwon and Armbrust 2005.

Para a determinação do comprimento de onda adequado para a deteção do citalopram, traçou-se um espectro de absorvência de uma solução, a 5 mg L^{-1} , entre 200 e 600 nm. Na figura 3.4 apresenta-se o de absorção deste composto.

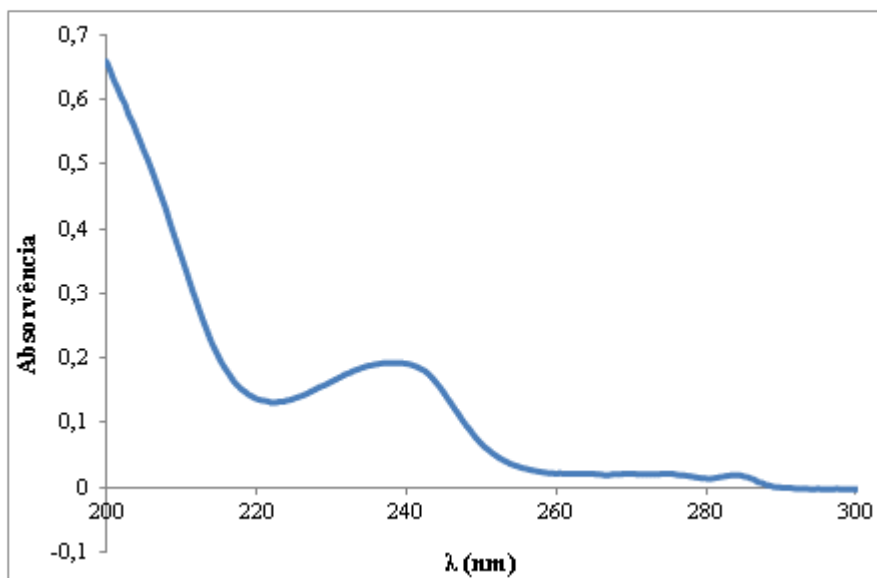


Figura 3.4: Espectro de UV-VIS para uma solução de citalopram de 5 mg L^{-1} , obtido utilizando uma célula com um percurso ótico de 1 cm num espectrofotómetro Shimadzu.

Pela observação da figura 3.4 observa-se um máximo local a 240 nm, tendo sido este comprimento de onda selecionado para a deteção deste composto.

Após diversos testes, foi escolhida como fase móvel a mistura de acetonitrilo e água acidificada (2% ácido acético, com pH ajustado a 3,6 com hidróxido de amónio) nas percentagens de 30% e 70%, respetivamente, em modo isocrático. As condições que levaram a esta escolha foram o reduzido tempo de análise, aliado à boa separação dos picos provenientes dos produtos de fotodegradação. O caudal escolhido foi de 0,90 mL min⁻¹ e o tempo total de análise foi de 20 minutos.

3.8. Estudo da fotodegradação na presença da porfirina (H₂TDMImP)

Como foi dito anteriormente, a porfirina tetracatiónica (H₂TDMImP) foi escolhida e uma vez que se trata de uma porfirina bastante solúvel em água o procedimento adaptado foi o mencionado nos estudos anteriores de fotodegradação. Foram preparadas soluções aquosas e irradiadas segundo o procedimento descrito na secção 3.4.1 e foram realizadas duas experiências com concentrações diferentes de porfirina. Na solução de citalopram 5 mg L⁻¹ e porfirina 5 mg L⁻¹, a irradiação foi feita durante 70 horas e com recolhas de alíquotas de 10 em 10 horas. Na solução de concentração de porfirina 10 mg L⁻¹, a recolha das amostras foi realizada de 10 em 10 horas e o tempo total de irradiação foi de 40 horas.

Foi também efetuado um estudo para avaliar a função do oxigénio singuleto no mecanismo de degradação sendo utilizada a azida de sódio (NaN₃) como sequestrador do ¹O₂, como dito anteriormente. Nesta irradiação o tempo de recolha de amostras foi de 3 em 3 horas e o tempo total da experiência foi de 27 horas. Depois de recolhidas alíquotas em intervalos de tempo controlados, a análise foi feita segundo o método referido na secção 3.7.2.

3.9. Estudo do efeito do oxigénio dissolvido (Citalopram)

Para estudar o efeito do oxigénio dissolvido na fotodegradação do citalopram, foram borbulhadas soluções deste fármaco com azoto (N₂) ou oxigénio (O₂) de forma a remover ou saturar, respetivamente, as soluções com oxigénio. O tempo estabelecido para este procedimento, para os gases mencionados, foi de 10 minutos para cada amostra. Este

controlo foi feito rigorosamente, por forma a garantir as mesmas condições de tubo para tubo. Posteriormente, os tubos borbulhados foram submetidos a irradiação com intervalos de tempo de 10 horas, retirando alíquotas de 1 mL em cada intervalo de tempo, para posterior análise. Estas amostras foram armazenadas no escuro a uma temperatura de 4°C (ver secção 3.4.1).

3.9.1. Produtos de fotodegradação - Espectrometria de Massa

Na identificação de possíveis produtos de fotodegradação do citalopram recorreu-se à técnica de espectrometria de massa com fonte de ionização de electrospray (ESI-MS, vindo do inglês *electrospray ionization mass spectrometry*) utilizando como detetor um espectrómetro de massa Micromass (Manchester, UK) Q-TOF2. As amostras analisadas foram diluídas em metanol (0,1% de ácido fórmico (v/v)). De seguida, as amostras foram introduzidas com caudal de 10 $\mu\text{L min}^{-1}$ na fonte de ESI. A temperatura da fonte foi de 80°C e a temperatura de dessolvatação foi de 150°C. A resolução do TOF (*time of flight*) foi programada para 9000. A voltagem do cone foi de 35 V e a do capilar foi de 3 KV. O espectro MS^2 foi obtido utilizando árgon como gás de colisão com energia de colisão programada entre 18 e 30 eV. Foi utilizado o software MassLynx (versão 4.0) para processar os dados obtidos. As amostras foram analisadas por ESI(+)MS não sendo submetidas a separação precedentemente à análise. Neste estudo foram analisadas uma amostra borbulhada com O_2 e submetida a radiação solar simulada durante 50 horas, um controlo no escuro (retirado da análise de irradiação a 60 horas) e uma solução padrão de citalopram a 5 mg L^{-1} . O espectro de massa obtido para o padrão foi utilizado para comparação com os espectros de massa das amostras referidas e os iões $[\text{M}+\text{H}]^+$ de possíveis produtos de fotodegradação foram identificados.

Numa segunda fase deste trabalho, por forma a completar e confirmar alguns resultados obtidos pela técnica descrita anteriormente, foi realizada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa (HPLC-MS). Assim, recorreu-se ao auxílio de um cromatógrafo líquido de alta eficiência, acoplado a um espectrometro de massa LTQ XL + Ultimate 3000 linear ion trap 2D. As amostras selecionadas foram analisadas não sendo submetidas a separação precedentemente à análise. As condições utilizadas neste método tiveram por base as condições descritas na

secção 3.7.2. Para a análise da fragmentação do citalopram foi utilizada uma solução padrão de citalopram de 5 mg L⁻¹, enquanto que para a tentativa de identificação dos produtos de fotodegradação foi analisada uma amostra borbulhada com O₂ e submetida a radiação solar simulada durante 50 horas (esta amostra foi liofilizada). Foi utilizado o software Thermo Xcalibur para manipulação dos dados obtidos.

4. *Tratamento e discussão de resultados*

4.1. *Determinação do diclofenac por HPLC-UV*

A figura 4.1 mostra um cromatograma típico obtido para o DCF. A partir da solução stock, prepararam-se seis padrões na gama de concentrações 0,50-10,0 mg L⁻¹. Com a área do pico de DCF de cada solução padrão em função das respectivas concentrações traçou-se a curva de calibração. A figura 4.2 mostra a curva de calibração obtida.

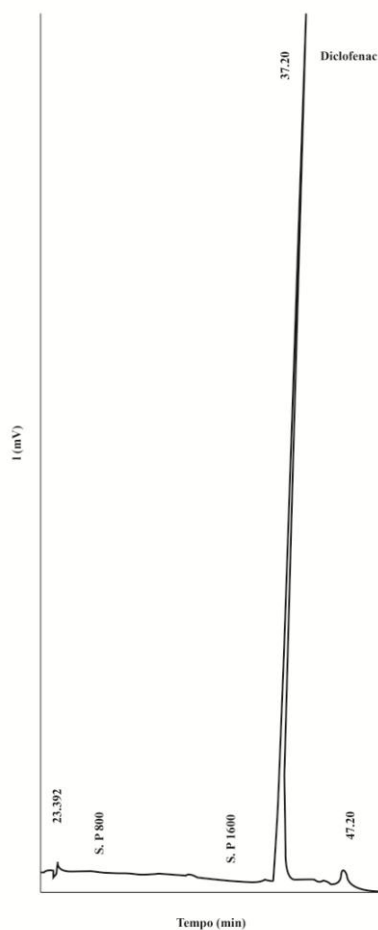


Figura 4.1: Cromatograma obtido para a solução stock de diclofenac 10 mg L⁻¹.

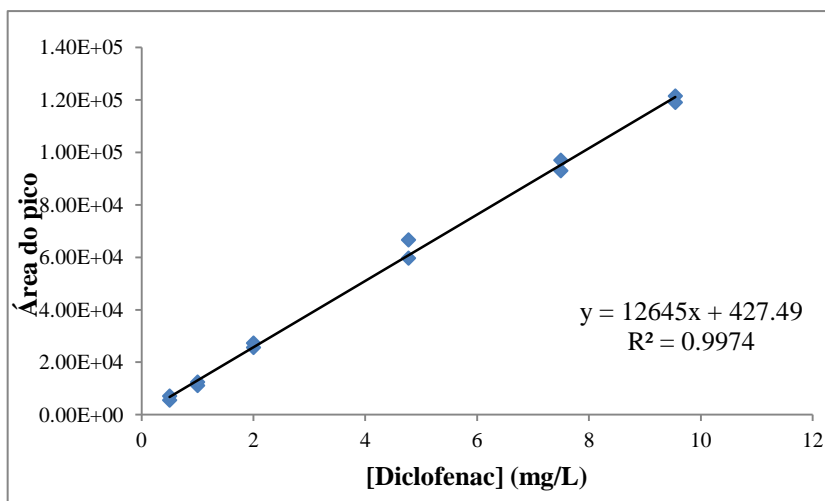


Figura 4.2: Curva de calibração do DCF (área do pico *versus* concentração das soluções padrão de DCF).

Ao longo deste trabalho foram efetuadas várias curvas de calibração, em alturas distintas, para assim garantir a repetibilidade do método utilizado para este composto. Obtiveram-se os coeficientes de correlação (r) (superiores a 0,99) e os limites de detecção respetivos. Através da equação (1) calculou-se o limite de detecção:

$$LD = \frac{3 \times S_{y/x}}{m} \quad (1)$$

onde $S_{y/x}$ corresponde ao desvio padrão dos resíduos segundo o eixo dos yy e m ao declive da reta,

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}} \quad (2)$$

onde n corresponde ao número de padrões, y_i corresponde aos valores de y experimentais e \hat{y}_i são os valores de y calculados através da curva de calibração (Miller & Miller 2005). O limite de deteção determinado para a curva do diclofenac foi de $0,352 \text{ mg L}^{-1}$.

4.2. Cinética de fotodegradação do diclofenac (10 mg L^{-1})

Na figura 4.3 encontra-se representada a variação da concentração do diclofenac em função do tempo de irradiação.

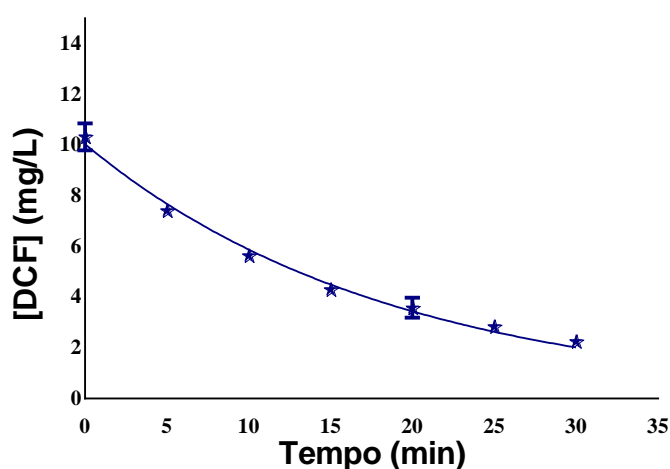


Figura 4.3: Cinética de pseudo-1ª ordem da fotodegradação da solução de DCF 10 mg L^{-1} . Cada ponto é referente a três réplicas ($\pm s$).

Verificou-se que, após 30 minutos de irradiação, a percentagem de degradação deste fármaco foi de 78%, seguindo uma cinética de pseudo-1ª ordem, como se pode verificar pelo bom ajuste da equação (4) aos resultados experimentais,

$$\frac{dC}{dt} = -kC \quad (3) \qquad C_t = C_0 \times e^{-kt} \quad (4)$$

onde C_t é a concentração do fármaco em estudo (mg L^{-1}) ao tempo t (min), C_0 é a concentração inicial do fármaco ao tempo zero (mg L^{-1}) e k é a constante de velocidade (min^{-1}), calculada por regressão não-linear (com $r^2=0,992$) com o auxílio do programa GraphPadPrism6®. Assim, a constante de velocidade para a fotodegradação do diclofenac

foi de $0,054 \pm 0,002 \text{ min}^{-1}$. A meia vida pode ser calculada a partir da constante de velocidade (k) usando a equação (5),

$$t_{1/2} = \ln 2 / k \quad (5)$$

sendo que, para o diclofenac, o tempo de meia vida calculado foi $13,0 \pm 0,5 \text{ min}$.

Zhang e seus colaboradores, efetuaram um estudo com diclofenac em que este fármaco foi submetido a irradiação simulada (foi utilizada uma lâmpada de arco xénon de 350 W) em que obtiveram uma degradação de cerca de 90% em 15 minutos. Estes autores utilizaram também diversos sequestradores de oxigénio, como por exemplo, a azida de sódio, e os resultados experimentais levaram à conclusão que a fotoxidação envolvida na fotodegradação do diclofenac é provocada via $\cdot\text{OH}$, $^1\text{O}_2$ e $\cdot\text{O}^{2-}$ quando submetido a luz solar simulada.

4.3. Determinação do citalopram por HPLC-UV

Através das condições otimizadas (subcapítulo 3.7.2) foi possível determinar analiticamente o citalopram. Na figura 4.4 apresenta-se um cromatograma da solução stock de 5 mg L^{-1} de citalopram. A partir da solução stock, prepararam-se sete padrões na gama de concentrações $0,60\text{-}7,0 \text{ mg L}^{-1}$. Através das áreas dos picos deste fármaco para diferentes padrões, foi possível obter a curva de calibração (figura 4.5).

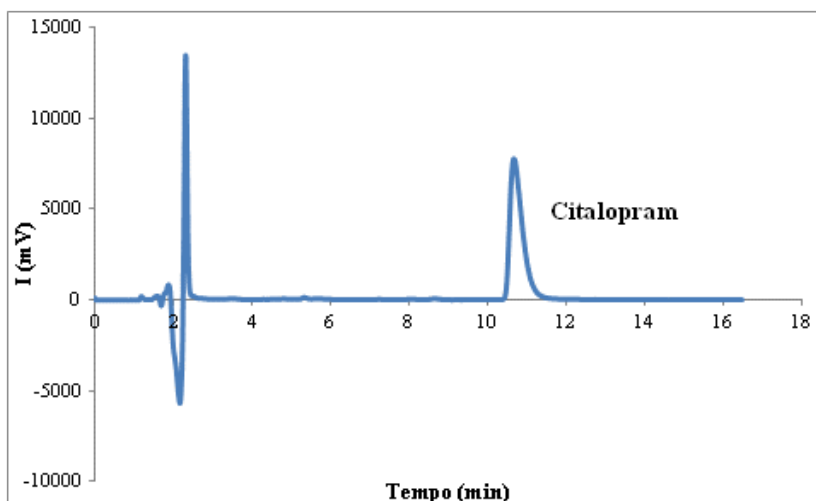


Figura 4.4: Cromatograma de HPLC obtido para a solução stock de CIT 5 mg L^{-1} .

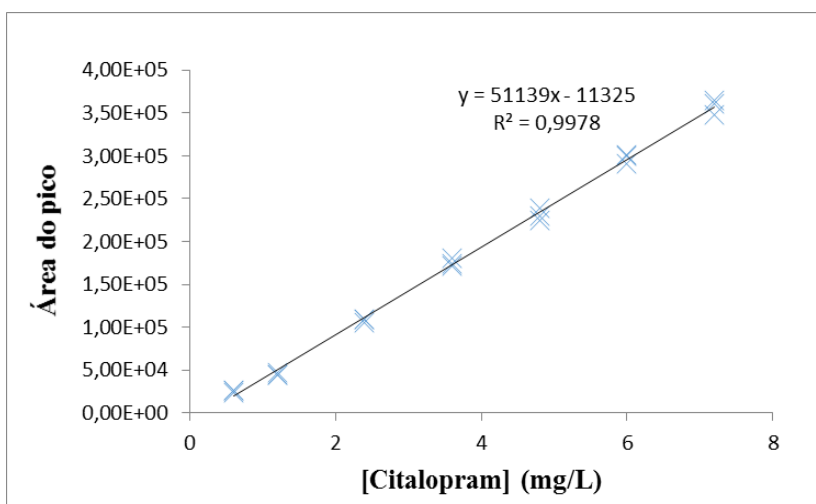


Figura 4.5: Curva de calibração do CIT (área do pico *versus* concentração das soluções padrão de CIT). Cada padrão foi analisado em triplicado.

Através da equação (1) descrita na secção 4.1 foi possível calcular o limite de deteção para a curva do citalopram sendo este $0,283 \text{ mg L}^{-1}$.

4.4. Cinética de fotodegradação de citalopram (5 mg L^{-1})

O estudo do efeito da radiação no citalopram foi feito através de uma irradiação de 110 horas de uma solução aquosa de citalopram com concentração inicial de 5 mg L^{-1} . Na figura 4.6 está representada a variação da concentração do fármaco em função do tempo.

Pela observação desta figura é possível verificar um decréscimo na concentração de citalopram quando submetido à irradiação com luz solar simulada, ainda que esta seja muito lenta. Neste estudo, com uma irradiação total de 110 horas, a degradação do citalopram foi de 76%, aproximadamente.

Com estes resultados foi possível concluir que a fotodegradação segue uma cinética de pseudo-1ª ordem, como se pode verificar pelo bom ajuste ($r^2=0.963$) dos resultados recorrendo à equação (4) apresentada anteriormente (figura 4.6).

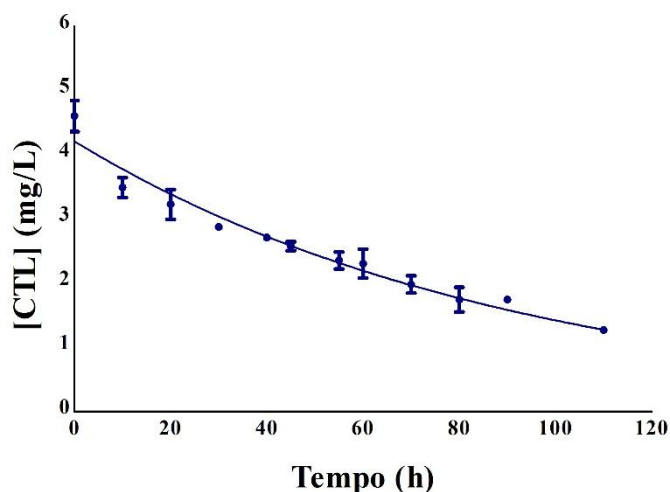


Figura 4.6: Cinética de pseudo-1ª ordem da fotodegradação da solução de CIT 5 mg L⁻¹. Cada ponto é referente a três réplicas ($\pm s$).

É possível assim calcular a constante de velocidade para a fotodegradação do citalopram sendo de $0,0109 \pm 0,0007 \text{ h}^{-1}$. Determinou-se, com o auxílio da equação (5), o tempo de meia vida de $63,6 \pm 4,1 \text{ h}$, isto é, são necessárias aproximadamente 64 horas de exposição à radiação para que 50% do composto seja degradado. Trata-se assim de uma degradação lenta deste fármaco em solução aquosa, sendo vantajoso o estudo da adição de fotossensibilizadores por forma a acelerar a velocidade de degradação do citalopram (este estudo vai ser abordado no subcapítulo seguinte).

4.5. Efeito da porfirina sobre a fotodegradação do citalopram (5 mg L^{-1})

Inicialmente e por forma a conhecer a absorção da porfirina em estudo (solução stock 5 mg L^{-1}), foi obtido o espectro UV-Vis desta sem ser submetida a qualquer radiação. De seguida, foram realizados testes de irradiação durante 5 e 24 horas, para perceber o efeito da radiação sobre a porfirina. Foi também analisado o efeito da temperatura na degradação da porfirina através da utilização dos controlos, tubos envolvidos em papel de alumínio de maneira a ficarem isolados da radiação (figura 4.7).

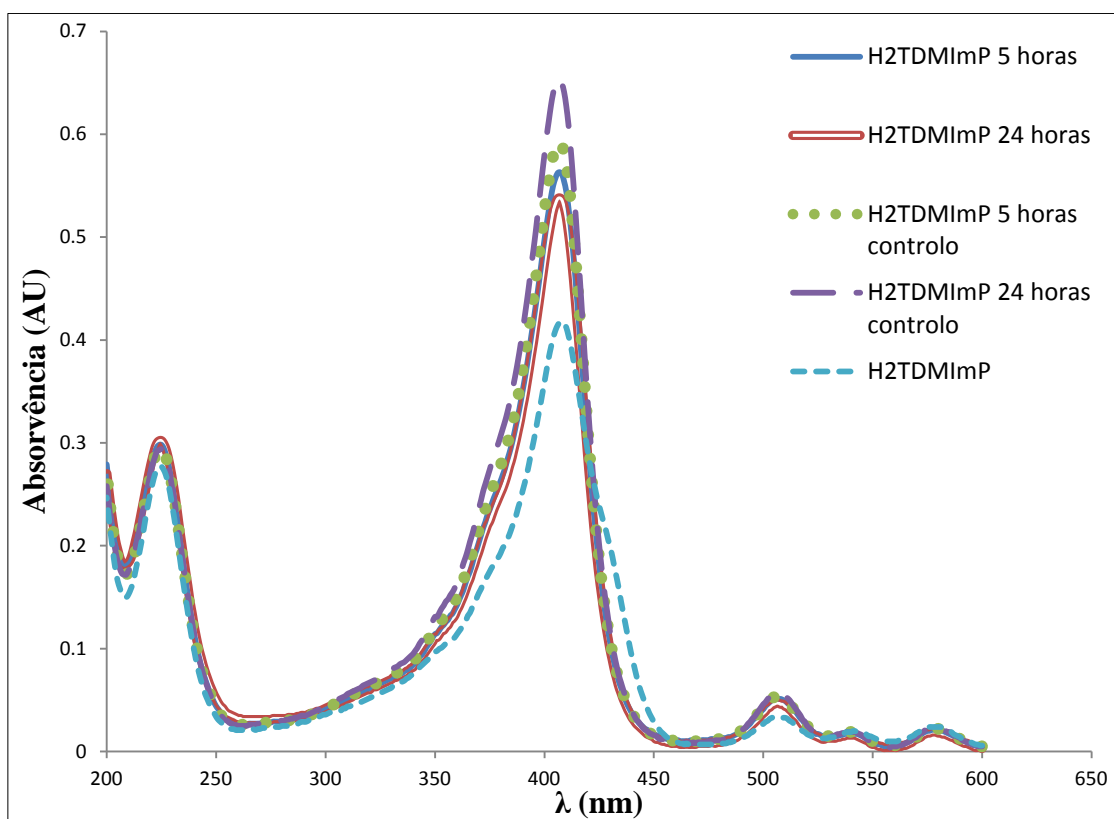


Figura 4.7: Espectros UV-Vis para uma solução de porfirina 5 mg L^{-1} não irradiada, e com 5 e 24 horas de irradiação e os respetivos controlos, utilizando um espectrofotómetro Shimadzu e usando uma célula com um percurso ótico de 1 cm.

Através da análise do espectro apresentado anteriormente foi possível confirmar a presença de porfirina ao fim de 24 horas de irradiação, tornando viável a aplicação do estudo proposto com este composto como possível fotossensibilizador.

4.5.1. Cinéticas de fotodegradação do citalopram na presença da porfirina $H_2TDMImP$

Como já foi referido anteriormente, o estudo da velocidade de degradação do citalopram foi realizado com a adição de porfirina. Estes testes foram efetuados com a porfirina a duas concentrações, isto é, com uma solução de porfirina a 5 mg L^{-1} e 10 mg L^{-1} (figura 4.8).

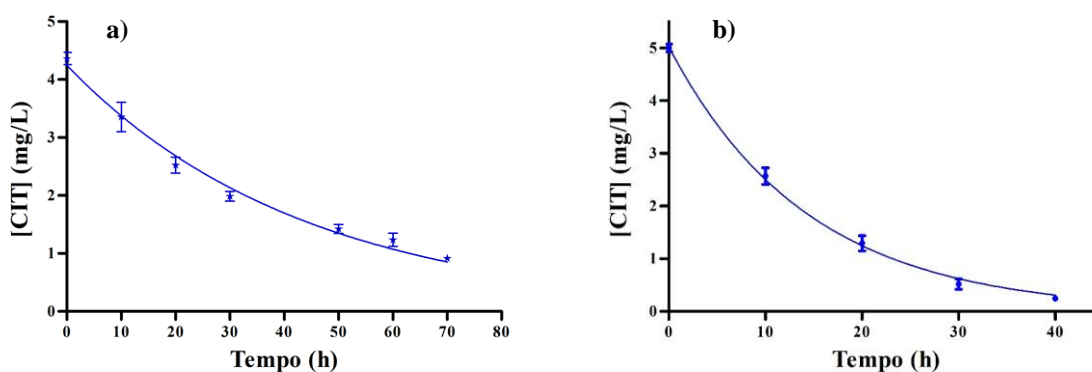


Figura 4.8: **a)** Cinética de pseudo-1ª ordem da fotodegradação da solução de CIT 5 mg L^{-1} e porfirina 5 mg L^{-1} . **b)** Cinética de pseudo-1ª ordem da fotodegradação da solução de CIT 5 mg L^{-1} e porfirina 10 mg L^{-1} . Cada ponto é referente a três réplicas ($\pm s$).

Nesta figura foi possível verificar o decréscimo da concentração de citalopram quando submetido a irradiação com porfirina ao longo do tempo. No estudo com a concentração de porfirina 5 mg L^{-1} (figura **a**)), com uma irradiação total de 70 horas, a taxa de degradação do citalopram foi cerca de 82%. Para o aumento de concentração da porfirina para o dobro (figura **b**)) observou-se um decréscimo na concentração de citalopram quando submetido a uma irradiação de apenas 40 horas, muito mais acentuada comparativamente aos estudos sem porfirina, sendo a percentagem de degradação de 99.8%.

Ajustando os resultados obtidos a uma cinética de pseudo-1ª ordem, recorrendo à equação (4) apresentada anteriormente, para a porfirina 5 mg L^{-1} , obtém-se a constante de velocidade para a fotodegradação de $0,023 \pm 0,001 \text{ h}^{-1}$. Por sua vez, com o aumento da concentração de porfirina 10 mg L^{-1} , a constante de velocidade para a fotodegradação de citalopram foi de $0,070 \pm 0,002 \text{ h}^{-1}$. Com o auxílio da equação (5), o tempo de meia vida

para a solução de porfirina com concentração mais baixa obtido foi de $30,3 \pm 1,1$ h e de $10,0 \pm 0,3$ h, com o dobro da concentração de porfirina. Simplificando, são necessárias aproximadamente 30 horas ou 10 horas, respetivamente, de exposição à radiação para que 50% do composto seja degradado em presença de $H_2TDMI\text{mP}$.

Para o estudo da fotodegradação de citalopram usando sequestradores da espécie 1O_2 , utilizou-se a azida de sódio como sequestrador desta espécie reativa. Esta vai reagir com o oxigénio singuleto e é possível verificar através das respetivas percentagens de degradação, na presença e ausência de azida de sódio, a importância do 1O_2 na fotodegradação do referido fármaco.

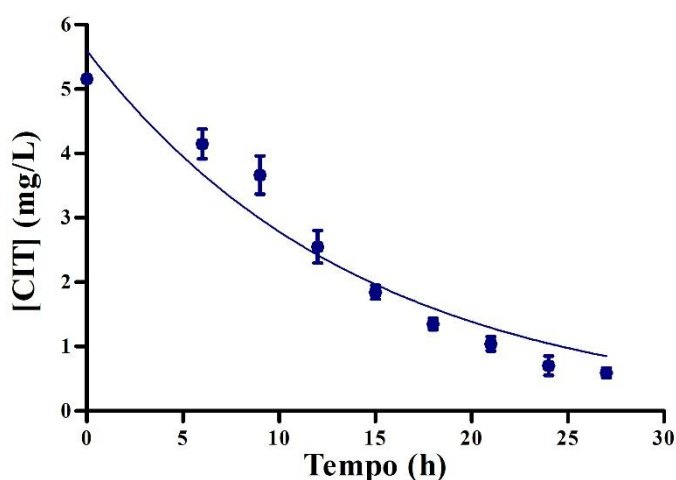


Figura 4.9: Cinética de pseudo-1ª ordem da fotodegradação da solução de CIT 5 mg L^{-1} , porfirina 5 mg L^{-1} e azida de sódio (4 mg L^{-1}). Cada ponto é referente à média de três réplicas ($\pm s$).

Nesta figura verifica-se o decréscimo da concentração de citalopram quando submetido a irradiação com porfirina e azida de sódio, ao longo do tempo, numa irradiação total de 27 horas. Foi possível verificar no final da análise uma taxa de degradação do citalopram de aproximadamente 85%. Com a equação (4) referida anteriormente, ajustou-se uma cinética de pseudo-1ª ordem em que se obteve a constante de velocidade para a fotodegradação de $0,070 \pm 0,007 \text{ h}^{-1}$. O tempo de meia vida obtido foi de $10,0 \pm 1,1$ h, determinado com o auxílio da equação (5), ou seja, são necessárias aproximadamente 10 horas de exposição à radiação para que 50% do composto seja degradado.

Comparando estes resultados com a cinética obtida na figura 4.8 a), em que se mantém a concentração de citalopram e de porfirina, o tempo de meia vida é 3 vezes mais baixo, ou seja, a adição da azida de sódio aumenta a velocidade de degradação do citalopram.

4.5.2. Cinética de fotodegradação do citalopram (5 mg L^{-1}) borbulhado com N_2

Para o estudo da influência do O_2 na fotodegradação do citalopram, foi efetuada uma irradiação com uma solução de citalopram de 5 mg L^{-1} borbulhada com N_2 segundo o método descrito na secção 3.9.

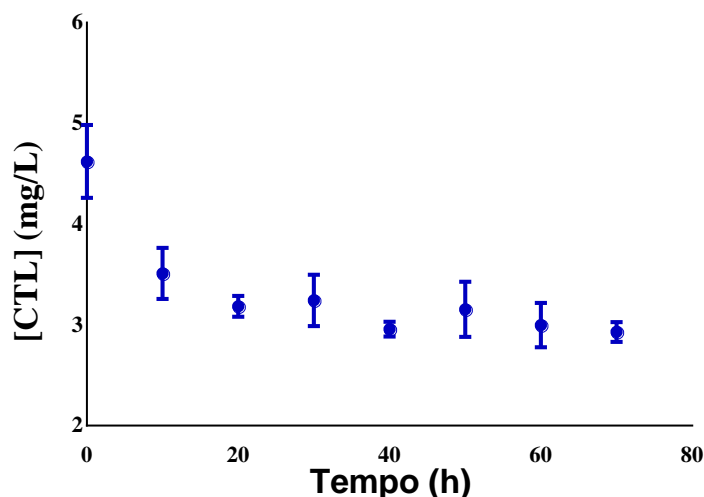


Figura 4.10: Cinética de pseudo-1ª ordem da fotodegradação da solução de CIT 5 mg L^{-1} , borbulhado com N_2 . Cada ponto é referente a três réplicas ($\pm s$).

Após uma irradiação de 70 horas, a percentagem de degradação do citalopram foi de 38,5%. Com os resultados obtidos, e à semelhança dos ajustes efetuados nos estudos anteriores, uma cinética de pseudo-1ª ordem foi ajustada. Contudo, não foi possível obter um bom ajuste ($r^2=0,641$) não sendo assim considerados estes resultados. Outras cinéticas foram ajustadas (cinética de 1ª ordem e 2ª ordem), não obtendo $r^2 > 0,6$. Na figura 4.10 é possível verificar a diminuição da concentração inicial do citalopram até às 10 horas de irradiação, mantendo-se constante até às 70 horas.

4.6. Relevância dos resultados em termos ambientais

Uma vez que os resultados apresentados são obtidos através da utilização de uma lâmpada que simula a luz solar, torna-se necessária a conversão destes resultados para as condições ambientais reais. Pelo estudo efetuado por Vione et al. e Minero et al., num dia de Verão sem nuvens (mais especificamente no dia 15 de Julho, 45 °N de latitude), a energia total que chega ao solo é de $7,5 \times 10^5 \text{ J m}^{-2}$ (290 - 400 nm). De notar que este estudo leva em conta o ciclo dia/noite como explica Vione et al. Estas medições foram auxiliadas pelo mesmo modelo de multímetro Co.fo.me.gra utilizado ao longo do trabalho experimental. Assim, é possível a conversão dos tempos de meia vida dos compostos estudados em Summer Sunny Days (SSD) (a energia total que chega ao solo durante 24 h sobre as condições acima referidas é equivalente a 3,8 h de irradiação sob as condições adotadas neste estudo). Com esta conversão é possível transformar os valores obtidos (estritamente relacionados com as condições experimentais usadas) em valores com relevância ambiental (Minero et al. 2007; Vione et al. 2006). Na tabela 4.1 encontram-se os resultados convertidos nos diversos estudos decorridos ao longo deste trabalho e o resumo dos resultados obtidos para as cinéticas de fotodegradação com a porfirina como fotossensibilizador ou com a utilização de um sequestrador de oxigénio singuleto.

Tabela 4.1: O coeficiente de correlação (r^2), a constante de velocidade (k) e o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) do citalopram (CIT) e diclofenac (DCF) obtidos através do ajuste dos resultados a uma cinética de pseudo-1ª ordem. O n representa o número de pontos utilizados na regressão e s o desvio padrão.

| | r^2 | n | $k \pm s/(\text{min}^{-1})$ | $t_{1/2} \pm s/(\text{min})$ | $t_{1/2} \pm s/(\text{SSD})$ |
|---------------------------------------|-------|-----|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| DCF | 0,992 | 7 | 0,054±0,002 | 13,0±0,6 | 0,057±0,003 |
| | r^2 | n | $k \pm s/(\text{h}^{-1})$ | $t_{1/2} \pm s/(\text{h})$ | $t_{1/2} \pm s/(\text{SSD})$ |
| CIT (110horas) | 0,963 | 12 | 0,0109±0,0007 | 63,6±4,1 | 16,7±1,1 |
| CIT+Porf (1:1) | 0,989 | 7 | 0,023±0,001 | 30,3±1,1 | 8,0±0,3 |
| CIT+Porf (1:2) | 0,999 | 5 | 0,070±0,002 | 10,0±0,3 | 2,62±0,09 |
| CIT+Porf (1:1)+NaN₃ | 0,981 | 9 | 0,070±0,007 | 10,0±1,1 | 2,6±0,3 |

4.7. Produtos resultantes da fotodegradação do citalopram por HPLC

Ao longo do estudo da fotodegradação do citalopram foi possível identificar a presença de alguns picos para além do pico do fármaco original. Na figura 4.11 encontra-se um exemplo de um cromatograma onde é possível a identificação de picos distintos (identificados com uma seta). Este cromatograma foi recolhido por HPLC após a análise de uma solução aquosa de citalopram 5 mg L⁻¹, quando submetida a irradiação de 50 horas e borbulhada com O₂ (ver secção 3.9).

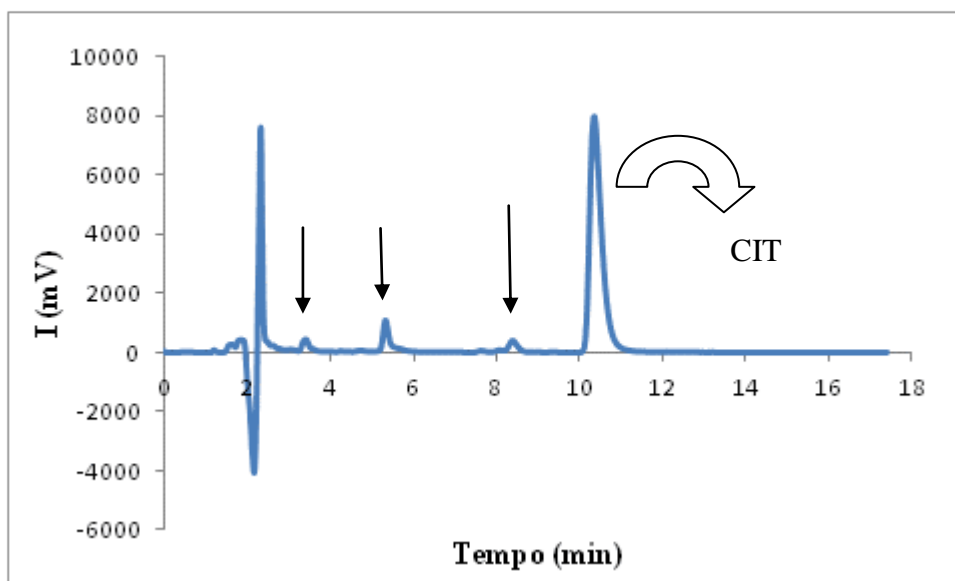


Figura 4.11: Cromatograma obtido para a solução de CIT 5 mg L⁻¹ borbulhada com O₂ durante 50h.

No cromatograma, para além dos picos do solvente e do pico do citalopram, com o tempo de retenção de aproximadamente 11 minutos, identificam-se 3 outros picos. Estes podem efetivamente pertencer a produtos resultantes de fotodegradação do composto, sendo estes mais polares. Na secção seguinte, serão identificados alguns desses produtos com a proposta da sua estrutura.

4.7.1. Identificação de produtos de fotodegradação do citalopram por Espectrometria de Massa

Uma vez que foram detetados picos para além do pico identificado como pertencendo ao composto (CIT) estudado, torna-se assim relevante a sua identificação. Pela análise do cromatograma verifica-se que são detetados vários produtos a tempo de retenção inferior ao do composto principal sendo portanto mais polares. Foi ainda detetado um composto com tempo de retenção superior ao do CIT, devendo este ser menos polar que este último. A identificação destes produtos formados por oxidação do CIT foi realizada por espectrometria de massa com ionização por electrospray (ESI-MS) e por espectrometria de massa tandem (ESI-MS/MS) no modo positivo.

Para a melhor compreensão da estrutura dos produtos de fotodegradação do CIT, foi estudado o perfil de fragmentação deste fármaco obtida por ESI-MS/MS.

Primeiramente, foi analisada uma solução stock de CIT 5 mg L⁻¹ por ESI(+)MS obtendo o íão molecular protonado [M+H]⁺ com m/z 325 (CIT). Por ESI-MS/MS foi possível identificar os íões fragmento e com a sua análise identificaram-se duas vias principais de fragmentação. Na figura 4.12 apresentam-se os espectros MSⁿ de alguns íões fragmento do CIT e na figura 4.13 é apresentado um esquema com um resumo das vias de fragmentação identificadas e estruturas dos íões fragmento. Estas vias podem resumir-se à ocorrência de protonação tanto no azoto da dimetilamina como no oxigénio do anel tetra-hidrofurano. Surge assim uma das vias de fragmentação com perda do grupo dimetilamina (45 Da, NH(CH₃)₂), dando origem à formação do íão com m/z 280, perda característica de fármacos com um grupo amina na cadeia lateral (Smyth et al. 2006). A outra via de fragmentação passa pela perda de água (18 Da, H₂O), ocorrendo a formação do íão com m/z 307. Com a perda conjunta de água e dimetilamina, ocorre a formação do íão fragmento com m/z 262, íão predominante na fragmentação do citalopram e que se poderá representar como sugerido na figura 4.14, sendo a estrutura da direita a mais estável. Na fragmentação deste íão, foi possível observar a formação dos íões com m/z 247, m/z 234, m/z 166, m/z 116 e m/z 109. Os íões com m/z 247 e m/z 234 correspondem à perda de radical metilo (15 Da, ·CH₃) e etileno (28 Da, CH₂=CH₂), respetivamente. O íão fragmento com m/z 109 é citado em estudos anteriores como característico da fragmentação do citalopram em modo positivo (Idborg, Edlund, and Jacobsson 2004). Na tabela 4.2 é apresentado um resumo da fragmentação deste composto.

Resumidamente, o mecanismo de fragmentação proposto foi suportado em estudos publicados anteriormente (Idborg, Edlund, and Jacobsson 2004; Sharma et al. 2011; Smyth et al. 2006; Thomas et al. 2012). Foi no entanto possível detetar alguns íões fragmento que não estavam referidos nestes estudos e assim contribuir para o melhor conhecimento da fragmentação do citalopram.

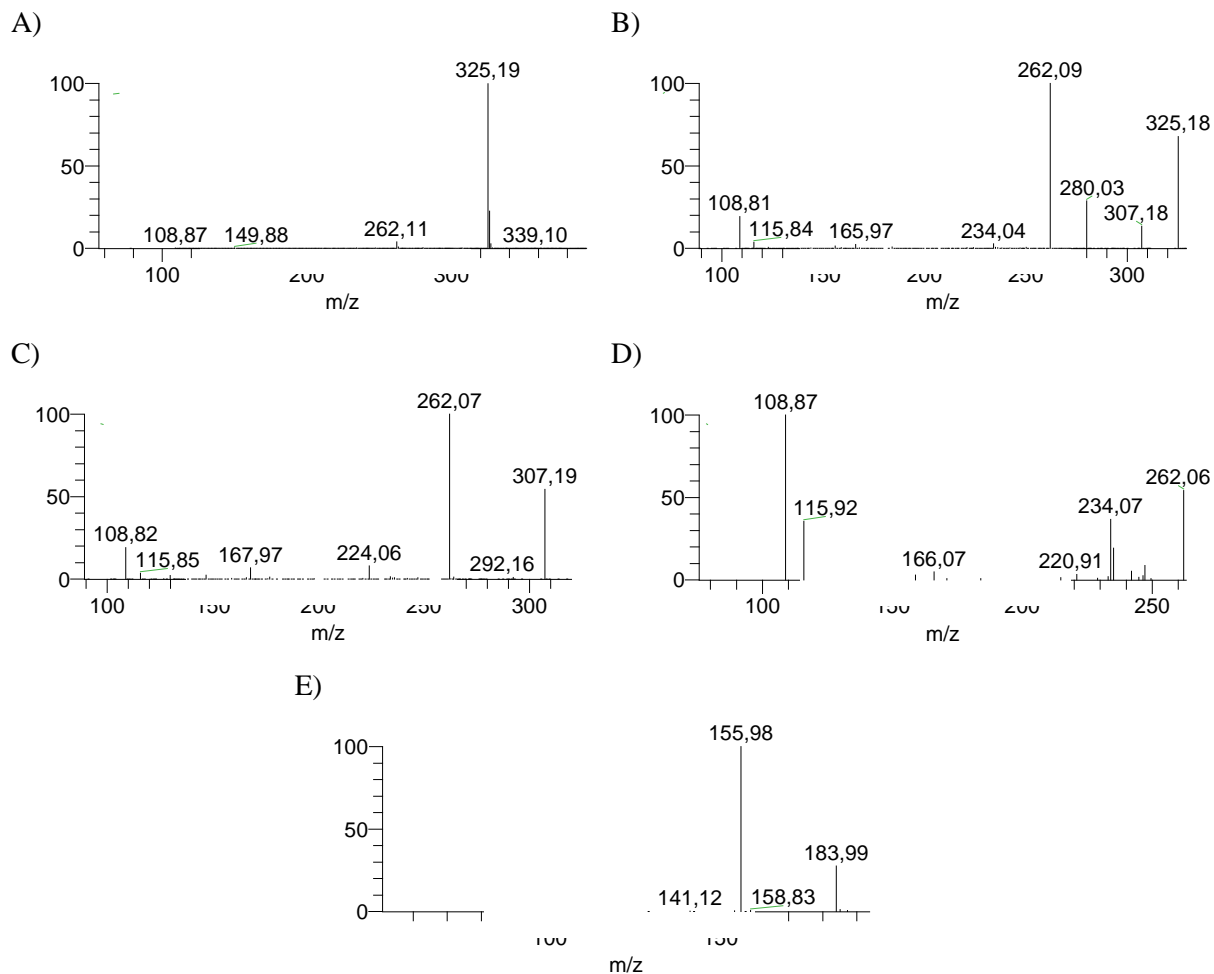


Figura 4.12: **A)** Espetro de massa do padrão (m/z 325); **B)** Espetro MS² de m/z 325; **C)** Espetro MS³ do ião fragmento m/z 307; **D)** Espetro MS⁴ do ião fragmento m/z 262; **E)** Espetro MS⁴ do ião fragmento m/z 184.

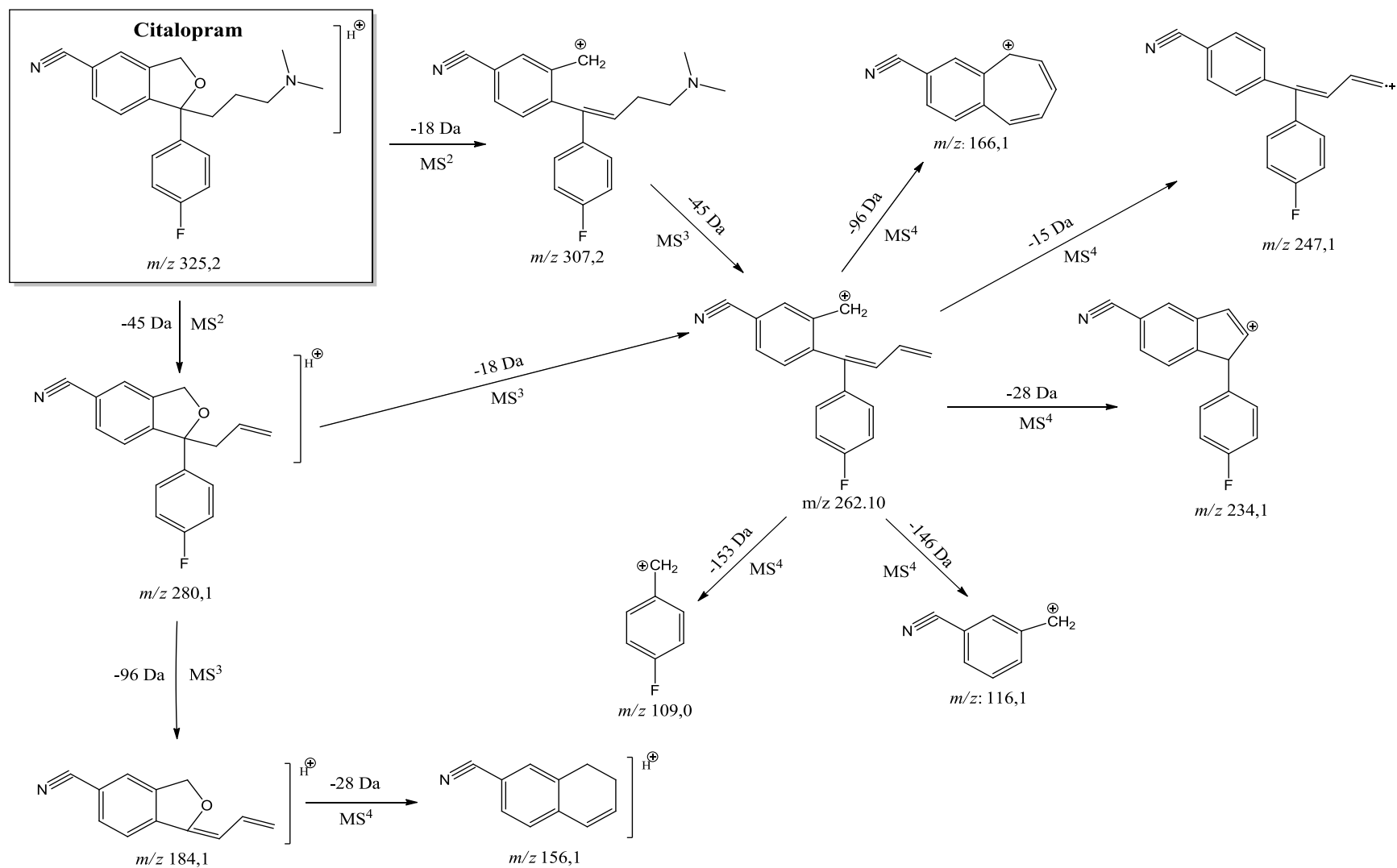


Figura 4.13: Perfil das vias de fragmentação do citalopram.

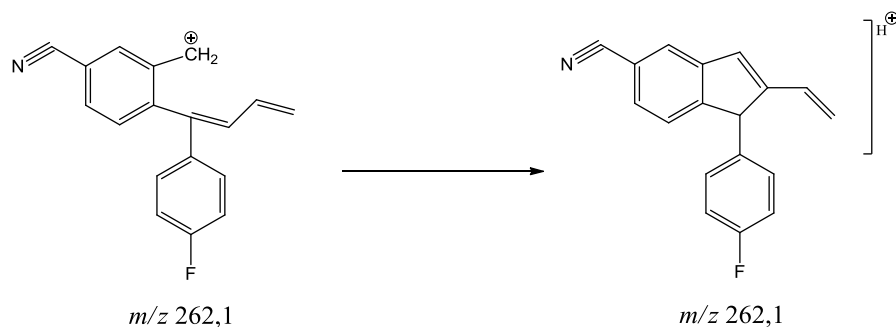


Figura 4.14: Estruturas propostas para o ião com m/z 262 (Sharma et al. 2011).

Tabela 4.2: Vias de fragmentação do citalopram: massa molecular (M_w), iões detetados em ESI(+) MS e iões fragmento detetados em ESI(+) MS^n . Os iões fragmento principais estão apresentados, assim como a respetiva abundância relativa e perdas associadas.

| Composto | M_w | ESI(+) MS m/z | ESI(+) MS^2 m/z (abundância relativa (%), perda) | ESI(+) MS^3 m/z (abundância relativa (%), perda) | ESI(+) MS^4 m/z (abundância relativa (%), perda) |
|----------|-------|----------------------|---|--|---|
| CIT | 324 | 325 $[M+H]^+$ | 307 (14, $-H_2O$) | 262 (100, $-NH(CH_3)_2$) 109 (20, $-C_{13}H_{16}N_2O$) | - |
| | | | 280 (29, $-NH(CH_3)_2$) | 262 (100, $-H_2O$) | - |
| | | | | 184 (2, $-C_6H_5F$) | 156 (100, $-CO$) |
| | | | 262 (100, $-H_2O$ e $-NH(CH_3)_2$) | 247 (11, $-CH_3$) 234 (40, $-CH_2=CH_2$) 166 (5, $-C_6H_5F$) 116 (36, $-C_{10}H_7F$) 109 (100, $-C_{11}H_7N$) | - |

Depois de estabelecido o perfil de fragmentação do citalopram e identificadas as duas principais vias de fragmentação, prosseguiu-se para o estudo dos produtos de fotodegradação. No decorrer deste trabalho, como dito no capítulo anterior, foram utilizados dois equipamentos de espectrometria de massa (ESI-TOF-MS e ESI-ion trap MS). Nas figuras 4.15 e 4.16 mostram-se três espectros comparativos das amostras analisadas por ESI(+)-TOF-MS.

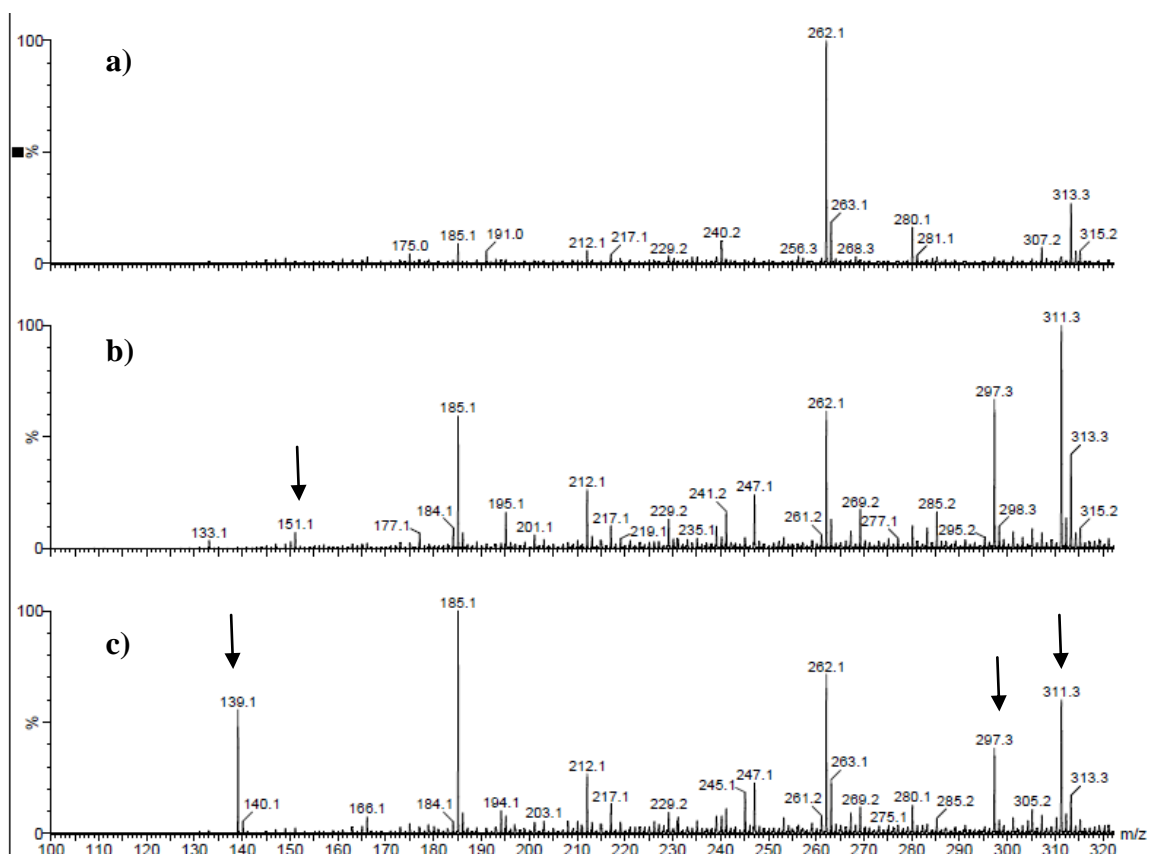


Figura 4.15: Espectros ESI(+)-TOF-MS no intervalo de m/z entre 100 e 320 em que **a)** solução padrão de CIT, **b)** solução de CIT não submetida a radiação solar (controle de temperatura) e **c)** solução de CIT submetida a radiação durante 50 h e borbulhada com O_2 .

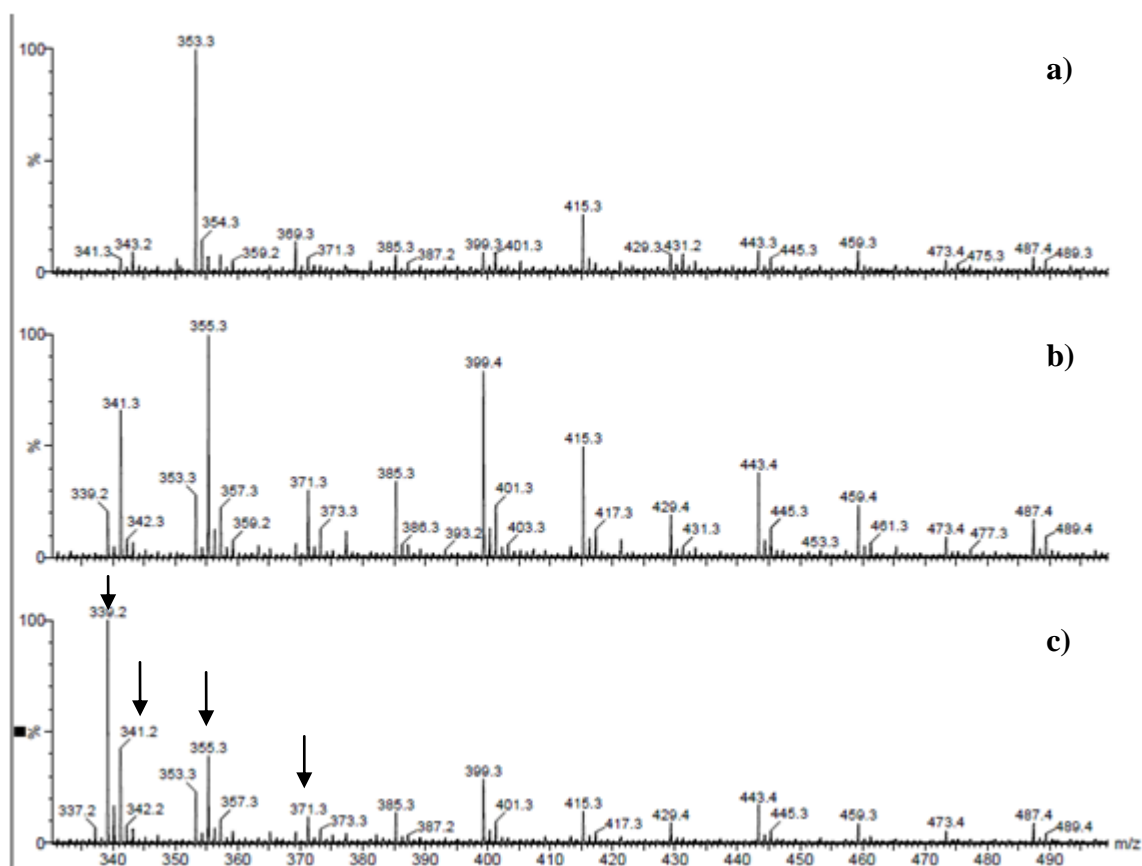


Figura 4.16: Espetros ESI(+)-TOF-MS no intervalo de m/z entre 330 e 500 em que **a)** solução padrão de CIT, **b)** solução de CIT não submetida a radiação solar (controlo de temperatura) e **c)** solução de CIT submetida a radiação durante 50 h e borbulhada com O_2 .

Alguns produtos de fotodegradação do citalopram foram identificados por espetrometria de massa sendo as respetivas estruturas propostas apresentadas na figura 4.17. Como dito anteriormente, e pela representação dos espetros nas figuras 4.15 e 4.16, as amostras são correspondentes a uma solução de citalopram padrão, solução de citalopram não submetida a radiação solar simulada (controlo no escuro) e solução de citalopram submetida a radiação durante 50 h e borbulhada com O_2 . Foram estudados os iões $[M+H]^+$ dos possíveis produtos de fotodegradação que apareciam na amostras irradiadas e não apareciam nos espetros de massa da solução padrão. Os fragmentos dos produtos de fotodegradação (tabela 4.3) foram estudados por ESI-MSⁿ por forma a tentar identificar a estrutura dos respetivos produtos. Contudo, é de salientar que as estruturas referidas são propostas fundamentadas mas não irrefutáveis.

Tabela 4.3: Dados de espectrometria de massa para a identificação dos produtos de fotodegradação do citalopram: massa molecular (M_w), íões detetados em ESI(+)MS e íões fragmento detetados em ESI(+)MSⁿ. Os principais íões fragmento foram apresentados, assim como a respetiva abundância relativa.

| Produto | M_w | ESI(+)MS m/z | ESI(+)MS ² m/z , abundância relativa (%) | ESI(+)MS ³ m/z , abundância relativa (%) |
|-------------|-------|------------------------|---|---|
| I | 296 | 297 [M+H] ⁺ | 283 (64) 279 (18) 267 (100) | -- |
| II | 310 | 311 [M+H] ⁺ | 293 (97) 281 (27) 263 (52) 249 (100) | -- |
| III | 338 | 339 [M+H] ⁺ | 321 (18) 294 (12) 276 (100) | -- |
| IVa) | 340 | 341 [M+H] ⁺ | 323 (100) 296 (14) 278 (82) 132 (4) 109 (2) | -- |
| IVb) | 340 | 341 [M+H] ⁺ | 280 (100) 262 (60) 116 (1) 109 (6) | -- |
| V | 354 | 355 [M+H] ⁺ | 337 (30) 294 (100) 276 (34) 243 (27) | -- |
| VI | 370 | 371 [M+H] ⁺ | 353 (100) —————→ 335(100) 341 (46) 311 (31) 326 (15) 308 (11) | 323 (35) 308 (67) 290 (26) |

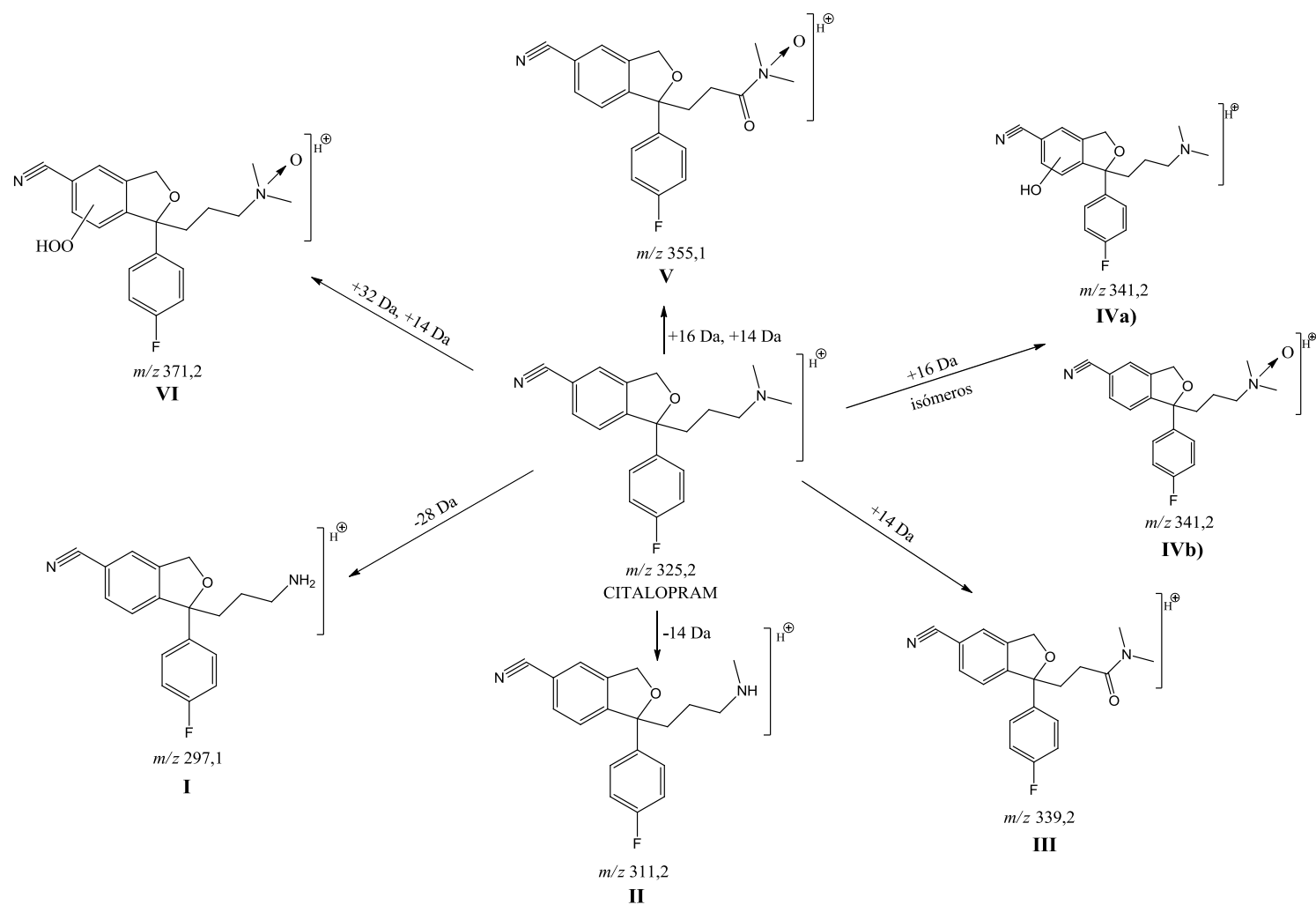


Figura 4.17: Esquema proposto para as vias de degradação do citalopram e respetivas estruturas.

Relativamente aos produtos de fotodegradação **I** (M_w 296, $[M+H]^+=297$) e **II** (M_w 310, $[M+H]^+=311$), estes foram detetados e facilmente identificados uma vez que existem estudos anteriores que suportam a proposta referida neste trabalho (Kwon & Armbrust 2005). Os produtos de fotodegradação **I** e **II** correspondem à *N,N*-desmetilação com perda de 28 Da e à *N*-desmetilação do citalopram, com perda de 14 Da, respetivamente.

Quanto ao produto de fotodegradação **III** (M_w 338, $[M+H]^+=339$), que corresponde ao citalopram (m/z 325) com mais 14 Da, ou seja possivelmente formado por oxidação em que houve uma adição de um átomo de oxigénio e menos 2 Da, foi possível atribuir-lhe a estrutura apresentada com base nos estudos de MSⁿ. De forma semelhante ao proposto para o CIT, existem duas vias de fragmentação alternativas, nomeadamente a perda de 18 Da seguida de perda de 45 Da e vice-versa, originando um fragmento de m/z 276 (que corresponde ao fragmento de m/z 262 do CIT + 14 Da). De forma análoga os fragmentos intermédios de m/z 321 e m/z 294 correspondem aos fragmentos m/z 307 do CIT + 14 Da e m/z 280 do CIT + 14 Da, respetivamente (um esquema resumo é apresentado na figura 4.18). A oxidação do citalopram poderia ocorrer na cadeia alifática, no azoto da dietilamina, nos anéis aromáticos ou no anel tetra-hidrofurano. Para ocorrer a oxidação na posição benzílica do anel tetra-hidrofurano, seria de prever a perda de 44 Da correspondendo à perda de CO₂, que não se observou, permitindo assim a exclusão desta via de oxidação. Por analogia com a fragmentação do CIT, a perda de água (-18 Da) apenas poderia ocorrer no anel tetra-hidrofurano. Sendo assim, e pela associação destas perdas, é possível justificar a estrutura proposta para o produto de fotodegradação **III**, que corresponde à cetona resultante da oxidação na cadeia alifática.

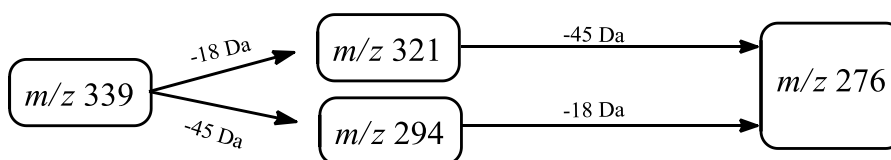


Figura 4.18: Esquema resumo das vias de fragmentação do íon com m/z 339.

Para os produtos de fotodegradação **IVa**) e **IVb**) (M_w 340, $[M+H]^+=341$) que se podem identificar como um produto de oxidação do citalopram (m/z 325) com a adição de 16 Da, isto é, provavelmente com a formação de um grupo hidroxilo, foram

propostas duas estruturas e correspondentes vias de fragmentação que foram elucidadas por MSⁿ. Os produtos **IVa**) e **IVb**) correspondem a dois isómeros, uma vez que, além das suas fragmentações serem distintas, também aparecem com tempos de retenção diferentes nos cromatogramas em HPLC-MS, sendo o produto de fotodegradação **IVa**) o mais polar, surgindo assim a tempo de retenção inferior ao tempo de retenção do citalopram. Para este produto, de forma idêntica à fragmentação do citalopram e do produto **III**, existem duas vias de fragmentação, nomeadamente a perda de 18 Da seguida de perda de 45 Da e vice-versa, originando um fragmento de m/z 278 (equivalente ao fragmento de m/z 262 do CIT + 16 Da). Da mesma forma se podem associar os fragmentos intermédios de m/z 323 e m/z 296 aos correspondentes fragmentos de m/z 307 do CIT + 16 Da e m/z 280 do CIT + 16 Da, respetivamente (um esquema resumo é apresentado na figura 4.19). Foi possível identificar ainda o ião com m/z 109, característico da fragmentação do citalopram, o que indica que não ocorreu oxidação no anel aromático do flúor. No entanto, observou-se a presença de um ião com m/z 132, correspondente ao ião de m/z 116 do CIT + 16 Da, o que justifica a hidroxilação no anel aromático do di-hidrobenzofurano (figura 4.17).

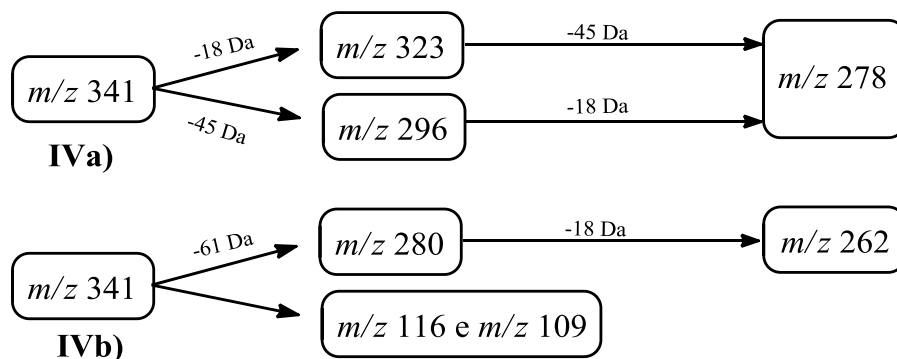


Figura 4.19: Esquemas resumo das vias de fragmentação dos íões com m/z 341.

Em relação ao produto de fotodegradação **IVb**), sendo mais apolar do que o citalopram e baseando-se na fragmentação obtida, propõe-se que seja o respetivo *N*-óxido resultante da oxidação da dimetilamina (Idborg, Edlund, and Jacobsson 2004). A via de fragmentação do produto **IVb**) envolve a perda do fragmento correspondente ao *N*-óxido da dimetilamina (-61 Da) seguida de perda de água (-18 Da), originando o ião fragmento com m/z 262. A presença dos íões fragmento com m/z 109 e m/z 116 indica que não ocorreu hidroxilação em nenhum dos anéis aromáticos do CIT.

Ao produto de fotodegradação **V** (M_w 354, $[M+H]^+=355$), cujos fragmentos obtidos por MS^n correspondem aos fragmentos observados para o citalopram (m/z 325) com mais 14 Da (mais um átomo de oxigénio e menos 2 Da) e mais 16 Da (mais um grupo hidroxilo), foi possível atribuir a estrutura apresentada (figura 4.17). Na análise do produto **V** verificaram-se duas vias de fragmentação envolvendo a perda de 18 Da seguida de perda de 61 Da e vice-versa, originando um fragmento de m/z 276 (que corresponde ao fragmento de m/z 262 do CIT + 14 Da). Assim, a perda de 61 Da e a ausência dos iões com m/z 125 ou m/z 132 (correspondentes aos iões com m/z 109 e m/z 116 hidroxilados) indicam a presença do *N*-óxido da dimetilamina e a ausência de hidroxilação nos anéis aromáticos. Seguidamente, apresenta-se um esquema resumindo a fragmentação mencionada para o ião com m/z 355 (figura 4.20).

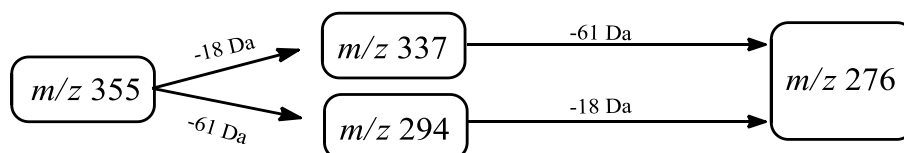
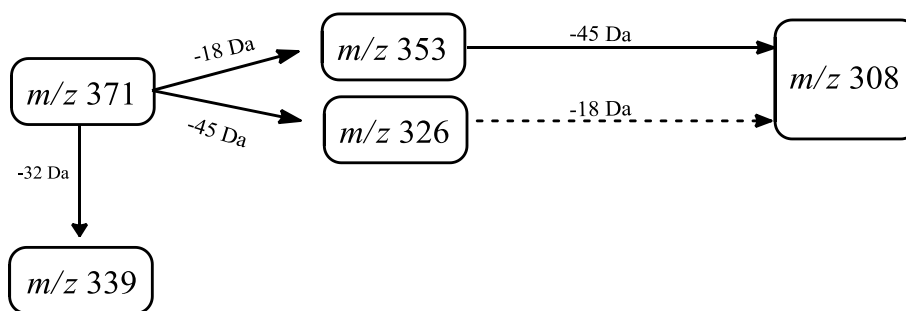


Figura 4.20: Esquema resumo das vias de fragmentação do ião com m/z 355.

Por último, para o produto de degradação **VI** (M_w 370, $[M+H]^+=371$), cuja razão massa/carga corresponde à do citalopram (m/z 325) com mais 46 Da, ou seja, a mais 14 Da (mais um átomo de oxigénio e menos 2 Da) e a mais 32 Da (mais dois grupos hidroxilo ou um grupo hidroperóxido), é sugerida a estrutura apresentada na figura 4.17. As vias de fragmentação propostas baseiam-se na perda de 18 Da seguida de perda de 45 Da e vice-versa, originando um fragmento de m/z 308. Foram observados os iões fragmento intermédios com m/z 353 (-18 Da) e m/z 326 (-45 Da), mas não se observou a perda de 61 Da, o que permitiu excluir a presença do grupo *N*-óxido. Por MS^2 do ião com m/z 371, não se observou a formação dos iões com m/z 109, 116, 125 ou 132, o que indica a ausência de hidroxilação aromática. Por outro lado, como foi observada a perda de 32 Da, originando o ião fragmento com m/z 339, e por analogia com a localização do hidroxilo no produto **IVa**), sugere-se a formação de um hidroperóxido no anel aromático do di-hidrobenzofurano (figura 4.21).



*a via a tracejada não foi analisada por MSⁿ.

Figura 4.21: Esquema resumo das vias de fragmentação do íon com m/z 371.

Na figura 4.22 é apresentado um cromatograma obtido por HPLC-MS de uma amostra oxigenada sujeita a radiação solar simulada durante 50h e liofilizada, onde alguns produtos de fotodegradação estão assinalados.

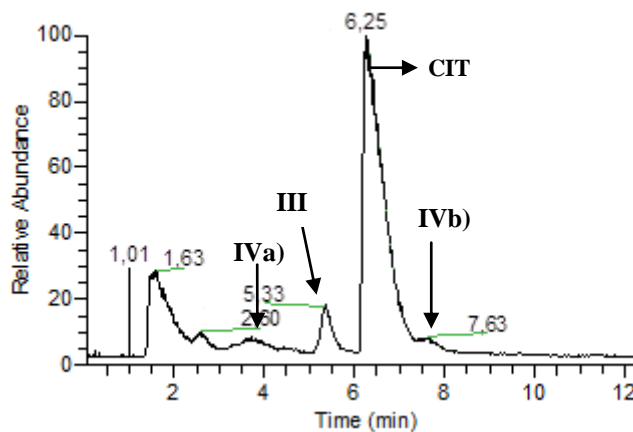


Figura 4.22: Cromatograma obtido por HPLC-MS para a solução liofilizada de CIT 5 mg L⁻¹ borbulhada com O₂ durante 50h.

5. *Conclusões*

Apesar do crescente interesse da comunidade científica sobre a ocorrência, destino e persistência dos fármacos no ambiente, ainda são necessários mais dados conclusivos relativamente a este tema. O trabalho desenvolvido teve como principais objetivos: o estudo do efeito da luz simulada (fotodegradação direta) no diclofenac e no citalopram; estudo do efeito de uma porfirina tetracatiónica na velocidade de degradação do citalopram; estudo da influência da azida de sódio como sequestrador ROS na degradação do citalopram e por fim a identificação de produtos de fotodegradação do citalopram.

No estudo do diclofenac, verificou-se que a velocidade de degradação deste fármaco é muito elevada, obtendo-se por fotodegradação direta, o tempo de meia vida de 0,1 SSD.

Para o estudo da velocidade de degradação do citalopram foi possível concluir que, tendo este fármaco uma velocidade de degradação muito lenta (tempo de meia vida de 16,7 SSD), a adição de um fotossensibilizador (porfirina) aumentou a velocidade de degradação em cerca de 6 vezes (tempo de meia vida de 2,62 SSD). Ao adicionar o sequestrador de oxigénio singuleto, azida de sódio, verificou-se um aumento da velocidade de degradação do citalopram (tempo de meia vida de 2,6 SSD comparativamente ao tempo de meia vida de 8,0 SSD, quando não se varia a concentração de fármaco ou de porfirina), o que indica que o oxigénio singuleto, pode não ser o principal responsável pela degradação deste fármaco.

Este estudo permitiu identificar a existência de produtos de fotodegradação decorrentes do processo de irradiação de luz solar simulada. Por análise MSⁿ, foi possível propor estruturas para seis dos produtos de fotodegradação. Na identificação do produtos de fotodegradação **IVa**) e **IVb**) concluiu-se que se tratam de dois isómeros com polaridades distintas, sendo o **IVa**) o mais polar.

Referências

- Alves, Eliana, Liliana Costa, Carla M B Carvalho, João P C Tomé, Maria A Faustino, Maria G P M S Neves, Augusto C Tomé, José A S Cavaleiro, Angela Cunha, and Adelaide Almeida. 2009. "Charge Effect on the Photoinactivation of Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria by Cationic Meso-Substituted Porphyrins." *BMC Microbiology* 9 (1). BioMed Central Ltd: 70.
- Bancirova, Martina. 2011. "Sodium Azide as a Specific Quencher of Singlet Oxygen during Chemiluminescent Detection by Luminol and Cypridina Luciferin Analogues." *Luminescence* 26 (6): 685–88.
- Bartels, Peter, and Wolf von Tümpling. 2007. "Solar Radiation Influence on the Decomposition Process of Diclofenac in Surface Waters." *Science of the Total Environment* 374 (1): 143–55.
- Behera, Shishir Kumar, Hyeong Woo Kim, Jeong-Eun Oh, and Hung-Suck Park. 2011. "Occurrence and Removal of Antibiotics, Hormones and Several Other Pharmaceuticals in Wastewater Treatment Plants of the Largest Industrial City of Korea." *The Science of the Total Environment* 409 (20): 4351–60.
- Bonnett, Raymond, and Gabriel Martinez. 2001. "Photobleaching of Sensitizers Used in Photodynamic Therapy." *Tetrahedron* 57: 9513–47.
- Boreen, AnneL., WilliamA. Arnold, and Kristopher McNeill. 2003. "Photodegradation of Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: A Review." *Aquatic Sciences* 65 (4). Birkhäuser-Verlag: 320–41.
- Brausch, John M, Kristin A Connors, Bryan W Brooks, and Gary M Rand. 2012. "Human Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: A Review of Recent Toxicological Studies and Considerations for Toxicity Testing." *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 218 (January): 1–99.

Brooks, Bryan W., Christy M. Foran, Sean M. Richards, James Weston, Philip K. Turner, Jacob K. Stanley, Keith R. Solomon, Marc Slattery, and Thomas W. La Point. 2003. "Aquatic Ecotoxicology of Fluoxetine." *Toxicology Letters* 142 (3): 169–83.

Brøsen, Kim, and Claudio A Naranjo. 2001. "Review of Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Interaction Studies with Citalopram." *European Neuropsychopharmacology* 11 (4): 275–83.

Bu, Qingwei, Bin Wang, Jun Huang, Shubo Deng, and Gang Yu. 2013. "Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Aquatic Environment in China: A Review." *Journal of Hazardous Materials* 262 (November): 189–211.

Calisto, Vânia, Arnold Bahlmann, Rudolf J Schneider, and Valdemar I Esteves. 2011. "Application of an ELISA to the Quantification of Carbamazepine in Ground, Surface and Wastewaters and Validation with LC-MS/MS." *Chemosphere* 84 (11): 1708–15.

Calisto, Vânia, and Valdemar I. Esteves. 2009. "Psychiatric Pharmaceuticals in the Environment." *Chemosphere*.

Calisto, Vânia Maria Amaro. 2011. "Environmental Occurrence and Fate of Psychiatric Pharmaceuticals." Universidade de Aveiro.

Changtong, Chuchawin, Daniel W. Carney, Lan Luo, Christopher A. Zoto, John L. Lombardi, and Robert E. Connors. 2013. "A Porphyrin Molecule That Generates, Traps, Stores, and Releases Singlet Oxygen." *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 260: 9–13.

Clara, M., N. Kreuzinger, B. Strenn, O. Gans, and H. Kroiss. 2005. "The Solids Retention Time - A Suitable Design Parameter to Evaluate the Capacity of Wastewater Treatment Plants to Remove Micropollutants." *Water Research* 39 (1): 97–106.

Comissão Europeia, 2015. Decisão de execução (UE) 2015/495 da comissão que estabelece uma lista de vigilância das substâncias para monitorização a nível da União no domínio da política da água nos termos da Diretiva 2008/105/CE do Parlamento Europeu e do Conselho <http://eur-lex.europa.eu/legal->

content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32015D0495&from=PT (Acedido em Novembro 2015).

De Voogt, P., M. L. Janex-Habibi, F. Sacher, L. Puijker, and M. Mons. 2009. “Development of a Common Priority List of Pharmaceuticals Relevant for the Water Cycle.” *Water Science and Technology* 59 (1): 39–46.

DeRosa, M. 2002. “Photosensitized Singlet Oxygen and Its Applications.” *Coordination Chemistry Reviews* 233-234 (November): 351–71.

Evgenidou, Eleni N., Ioannis K. Konstantinou, and Dimitra A. Lambropoulou. 2015. “Occurrence and Removal of Transformation Products of PPCPs and Illicit Drugs in Wastewaters: A Review.” *Science of The Total Environment* 505 (February): 905–26.

Fatta-Kassinos, Despo, Sureyya Meric, and Anastasia Nikolaou. 2011. “Pharmaceutical Residues in Environmental Waters and Wastewater: Current State of Knowledge and Future Research.” *Analytical and Bioanalytical Chemistry*.

Fick, Jerker, Hanna Söderström, Richard H Lindberg, Chau Phan, Mats Tysklind, and D G Joakim Larsson. 2009. “Contamination of Surface, Ground, and Drinking Water from Pharmaceutical Production.” *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC* 28 (12): 2522–27.

Gao, Pin, Yunjie Ding, Hui Li, and Irene Xagorarakis. 2012. “Occurrence of Pharmaceuticals in a Municipal Wastewater Treatment Plant: Mass Balance and Removal Processes.” *Chemosphere* 88 (1): 17–24.

Gómez, M. J., M. J. Martínez Bueno, S. Lacorte, A. R. Fernández-Alba, and A. Agüera. 2007. “Pilot Survey Monitoring Pharmaceuticals and Related Compounds in a Sewage Treatment Plant Located on the Mediterranean Coast.” *Chemosphere* 66 (6): 993–1002.

González Alonso, Silvia, Myriam Catalá, Raúl Romo Maroto, José Luis Rodríguez Gil, Ángel Gil de Miguel, and Yolanda Valcárcel. 2010. “Pollution by Psychoactive Pharmaceuticals in the Rivers of Madrid Metropolitan Area (Spain).” *Environment International* 36 (2): 195–201.

GREEN, RHYS E., MARK A. TAGGART, DEVOJIT DAS, DEBORAH J. PAIN, C. SASHI KUMAR, ANDREW A. CUNNINGHAM, and RICHARD CUTHBERT. 2006. "Collapse of Asian Vulture Populations: Risk of Mortality from Residues of the Veterinary Drug Diclofenac in Carcasses of Treated Cattle." *Journal of Applied Ecology* 43 (5): 949–56.

Gros, Meritxell, Sara Rodríguez-Mozaz, and Damià Barceló. 2012. "Fast and Comprehensive Multi-Residue Analysis of a Broad Range of Human and Veterinary Pharmaceuticals and Some of Their Metabolites in Surface and Treated Waters by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled to Quadrupole-Linear Ion Trap Tandem." *Journal of Chromatography. A* 1248 (July): 104–21.

H. Jones, O. A., N. Voulvoulis, and J. N. Lester. 2005. "Human Pharmaceuticals in Wastewater Treatment Processes." *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 35 (4): 401–27.

Henry, T B, J W Kwon, K L Armbrust, and M C Black. 2004. "Acute and Chronic Toxicity of Five Selective Serotonin Reuptake Inhibitors in *Ceriodaphnia Dubia*." *Environmental Toxicology and Chemistry* 23 (9): 2229–33.

Herath, Ajith C., R. M G Rajapakse, Anura Wicramasinghe, and Veranja Karunaratne. 2009. "Photodegradation of Triphenylamino Methane (magenta) by Photosensitizer in Oxygenated Solutions." *Environmental Science and Technology* 43 (1): 176–80.

Hignite, Charles, and Daniel L. Azarnoff. 1977. "Drugs and Drug Metabolites as Environmental Contaminants: Chlorophenoxyisobutyrate and Salicylic Acid in Sewage Water Effluent." *Life Sciences* 20 (2): 337–41.

Himmelsbach, Markus, Wolfgang Buchberger, and Christian W. Klampfl. 2006. "Determination of Antidepressants in Surface and Waste Water Samples by Capillary Electrophoresis with Electrospray Ionization Mass Spectrometric Detection after Preconcentration Using off-Line Solid-Phase Extraction." *Electrophoresis* 27 (5-6): 1220–26.

Homem, Vera, and Lúcia Santos. 2011. "Degradation and Removal Methods of Antibiotics from Aqueous Matrices - A Review." *Journal of Environmental Management*.

Idborg, Helena, Per-Olof Edlund, and Sven P Jacobsson. 2004. "Multivariate Approaches for Efficient Detection of Potential Metabolites from Liquid Chromatography/mass Spectrometry Data." *Rapid Communications in Mass Spectrometry* : RCM 18 (9): 944–54.

Infarmed, 2015. Análise da Evolução da Utilização de Psicofármacos em Portugal Continental entre 2000 e 2009 http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/MONITORIZACAO_DO_MERCADO/OBSERVATORIO/INTRODUCAO_DE_FICHEIROS/Estudo_psicofarmacos.pdf (Acedido em Novembro de 2015).

Jelic, Aleksandra, Meritxell Gros, Antoni Ginebreda, Raquel Cespedes-Sánchez, Francesc Ventura, Mira Petrovic, and Damia Barcelo. 2011. "Occurrence, Partition and Removal of Pharmaceuticals in Sewage Water and Sludge during Wastewater Treatment." *Water Research* 45 (3): 1165–76.

Josefsen, Leanne B, and Ross W Boyle. 2012. "Unique Diagnostic and Therapeutic Roles of Porphyrins and Phthalocyanines in Photodynamic Therapy, Imaging and Theranostics." *Theranostics* 2 (9). Sydney: Ivyspring International Publisher: 916–66.

Joss, Adriano, Sebastian Zabczynski, Anke Göbel, Burkhard Hoffmann, Dirk Löffler, Christa S. McArdell, Thomas A. Ternes, Angela Thomsen, and Hansruedi Siegrist. 2006. "Biological Degradation of Pharmaceuticals in Municipal Wastewater Treatment: Proposing a Classification Scheme." *Water Research* 40 (8): 1686–96.

Kosjek, Tina, and Ester Heath. 2010. "Tools for Evaluating Selective Serotonin Re-Uptake Inhibitor Residues as Environmental Contaminants." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 29 (8): 832–47.

Kümmerer, Klaus. 2001. "Drugs in the Environment: Emission of Drugs, Diagnostic Aids and Disinfectants into Wastewater by Hospitals in Relation to Other Sources – a Review." *Chemosphere* 45 (6-7): 957–69.

- Kümmerer, Klaus. 2009. "The Presence of Pharmaceuticals in the Environment due to Human Use--Present Knowledge and Future Challenges." *Journal of Environmental Management* 90 (8): 2354–66.
- Kwon, Jeong-Wook, and Kevin L. Armbrust. 2005. "DEGRADATION OF CITALOPRAM BY SIMULATED SUNLIGHT." *Environmental Toxicology and Chemistry* 24 (7): 1618.
- Lajeunesse, A, C Gagnon, and S Sauvé. 2008. "Determination of Basic Antidepressants and Their N-Desmethyl Metabolites in Raw Sewage and Wastewater Using Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry." *Analytical Chemistry* 80 (14). American Chemical Society: 5325–33.
- Lajeunesse, A, S A Smyth, K Barclay, S Sauvé, and C Gagnon. 2012. "Distribution of Antidepressant Residues in Wastewater and Biosolids Following Different Treatment Processes by Municipal Wastewater Treatment Plants in Canada." *Water Research* 46 (17): 5600–5612.
- Lee, Hing-Biu, Thomas E Peart, and M Lewina Svoboda. 2005. "Determination of Endocrine-Disrupting Phenols, Acidic Pharmaceuticals, and Personal-Care Products in Sewage by Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry." *Journal of Chromatography. A* 1094 (1-2): 122–29.
- Li, W C. 2014. "Occurrence, Sources, and Fate of Pharmaceuticals in Aquatic Environment and Soil." *Environmental Pollution* 187 (0): 193–201.
- Lin, Angela Yu-Chen, and Yu-Ting Tsai. 2009. "Occurrence of Pharmaceuticals in Taiwan's Surface Waters: Impact of Waste Streams from Hospitals and Pharmaceutical Production Facilities." *The Science of the Total Environment* 407 (12): 3793–3802.
- Lin, Angela Yu-Chen, Tsung-Hsien Yu, and Shaik Khaja Lateef. 2009. "Removal of Pharmaceuticals in Secondary Wastewater Treatment Processes in Taiwan." *Journal of Hazardous Materials* 167 (1-3): 1163–69.

Lindberg, Richard H, Marcus Östman, Ulrika Olofsson, Roman Grabic, and Jerker Fick. 2014. “Occurrence and Behaviour of 105 Active Pharmaceutical Ingredients in Sewage Waters of a Municipal Sewer Collection System.” *Water Research* 58 (July): 221–29.

Lolić, Aleksandar, Paula Paíga, Lúcia H M L M Santos, Sandra Ramos, Manuela Correia, and Cristina Delerue-Matos. 2015. “Assessment of Non-Steroidal Anti-Inflammatory and Analgesic Pharmaceuticals in Seawaters of North of Portugal: Occurrence and Environmental Risk.” *The Science of the Total Environment* 508 (March): 240–50.

Luo, Yunlong, Wenshan Guo, Huu Hao Ngo, Long Duc Nghiem, Faisal Ibney Hai, Jian Zhang, Shuang Liang, and Xiaochang C Wang. 2014. “A Review on the Occurrence of Micropollutants in the Aquatic Environment and Their Fate and Removal during Wastewater Treatment.” *The Science of the Total Environment* 473-474 (March): 619–41.

Macek, J, P Ptáček, and J Klíma. 2001. “Rapid Determination of Citalopram in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography.” *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 755 (1-2): 279–85.

MacLeod, Sherri L, Priya Sudhir, and Charles S Wong. 2007. “Stereoisomer Analysis of Wastewater-Derived Beta-Blockers, Selective Serotonin Re-Uptake Inhibitors, and Salbutamol by High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry.” *Journal of Chromatography. A* 1170 (1-2): 23–33.

Melo, Silene Alessandra Santos, Alam Gustavo Trovó, Ivonete Rossi Bautitz, and Raquel Fernandes Pupo Nogueira. 2009. “Degradação de Fármacos Residuais Por Processos Oxidativos Avançados.” *Química Nova* 32 (1). SBQ: 188–97.

Minero, Claudio, Serge Chiron, Gianpaolo Falletti, Valter Maurino, Ezio Pelizzetti, Roberto Ajassa, Maria Eugenia Carlotti, and Davide Vione. 2007. “Photochemical Processes Involving Nitrite in Surface Water Samples.” *Aquatic Sciences* 69 (1): 71–85.

Musa, Klefah A K, and Leif A Eriksson. 2009. “Photodegradation Mechanism of the Common Non-Steroid Anti-Inflammatory Drug Diclofenac and Its Carbazole

Photoproduct.” *Physical Chemistry Chemical Physics* 11 (22). The Royal Society of Chemistry: 4601–10.

NASA, 2008. <http://mirador.gsfc.nasa.gov> (Acedido em Março de 2011)

Neves, Cláudia M. B., Mário M. Q. Simões, M. Rosário M. Domínguez, Isabel C. M. S. Santos, M. Graça P. M. S. Neves, Filipe A. Almeida Paz, Artur M. S. Silva, and José A. S. Cavaleiro. 2012. “Oxidation of Diclofenac Catalyzed by Manganese Porphyrins: Synthesis of Novel Diclofenac Derivatives.” *RSC Advances* 2 (19). The Royal Society of Chemistry: 7427.

Ngui, J S, W Tang, R A Stearns, M Shou, R R Miller, Y Zhang, J H Lin, and T A Baillie. 2000. “Cytochrome P450 3A4-Mediated Interaction of Diclofenac and Quinidine.” *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 28 (9): 1043–50.

OECD, 2011. Health at a Glance. <http://www.oecd.org/els/health-systems/49105858.pdf> (Acedido em Setembro de 2014).

OECD, 2015. Health at a Glance. <http://www.keepeek.com/Digital-Asset-Management/oecd/social-issues-migration-health/health-at-a-glance-2015-en#page1> (Acedido em Novembro de 2015).

Pérez, Sandra, and Damià Barceló. 2007. “Fate and Occurrence of X-Ray Contrast Media in the Environment.” *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387 (4). Springer-Verlag: 1235–46.

Rodil, Rosario, José Benito Quintana, Estefanía Concha-Graña, Purificación López-Mahía, Soledad Muniategui-Lorenzo, and Darío Prada-Rodríguez. 2012. “Emerging Pollutants in Sewage, Surface and Drinking Water in Galicia (NW Spain).” *Chemosphere* 86 (10): 1040–49.

Rosal, Roberto, Antonio Rodríguez, José Antonio Perdigón-Melón, Alice Petre, Eloy García-Calvo, María José Gómez, Ana Agüera, and Amadeo R Fernández-Alba. 2010. “Occurrence of Emerging Pollutants in Urban Wastewater and Their Removal through Biological Treatment Followed by Ozonation.” *Water Research* 44 (2): 578–88.

- Rosi-Marshall, EmmaJ., and ToddV. Royer. 2012. "Pharmaceutical Compounds and Ecosystem Function: An Emerging Research Challenge for Aquatic Ecologists." *Ecosystems* 15 (6). Springer-Verlag: 867–80.
- Rotomskis, R., G. Streckyte, and S. Bagdonas. 1997. "Phototransformations of Sensitizers 1. Significance of the Nature of the Sensitizer in the Photobleaching Process and Photoproduct Formation in Aqueous Solution." *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 39 (2): 167–71.
- Rúa-Gómez, Paola C, and Wilhelm Püttmann. 2013. "Degradation of Lidocaine, Tramadol, Venlafaxine and the Metabolites O-Desmethyltramadol and O-Desmethylvenlafaxine in Surface Waters." *Chemosphere* 90 (6): 1952–59.
- Runnalls, Tamsin J, Luigi Margiotta-Casaluci, Subramaniam Kugathas, and John P Sumpter. 2010. "Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: Steroids and Anti-Steroids as High Priorities for Research." *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 16 (6). Taylor & Francis: 1318–38.
- Sacher, Frank, Frank Thomas Lange, Heinz-Jürgen Brauch, and Iris Blankenhorn. 2001. "Pharmaceuticals in Groundwaters." *Journal of Chromatography A* 938 (1-2): 199–210.
- Sanderson, H. 2003. "Probabilistic Hazard Assessment of Environmentally Occurring Pharmaceuticals Toxicity to Fish, Daphnids and Algae by ECOSAR Screening." *Toxicology Letters* 144 (3): 383–95.
- Santoke, Hanoz, Weihua Song, William J Cooper, and Barrie M Peake. 2012. "Advanced Oxidation Treatment and Photochemical Fate of Selected Antidepressant Pharmaceuticals in Solutions of Suwannee River Humic Acid." *Journal of Hazardous Materials* 217-218 (May): 382–90.
- Santos, Lúcia H M L M, A N Araújo, Adriano Fachini, A Pena, C Delerue-Matos, and M C B S M Montenegro. 2010. "Ecotoxicological Aspects Related to the Presence of Pharmaceuticals in the Aquatic Environment." *Journal of Hazardous Materials* 175 (1-3): 45–95.

Schwaiger, J, H Ferling, U Mallow, H Wintermayr, and R D Negele. 2004. “Toxic Effects of the Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug Diclofenac. Part I: Histopathological Alterations and Bioaccumulation in Rainbow Trout.” *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 68 (2): 141–50.

Sharma, Manav, Parikshit R Jawa, Ravinder S Gill, and Gulshan Bansal. 2011. “Citalopram Hydrobromide: Degradation Product Characterization and a Validated Stability-Indicating LC-UV Method.” *Journal of the Brazilian Chemical Society* 22 (5). Brazilian Chemical Society: 836–48.

Silva, Liliana J G, Celeste M Lino, Leonor M Meisel, and Angelina Pena. 2012. “Selective Serotonin Re-Uptake Inhibitors (SSRIs) in the Aquatic Environment: An Ecopharmacovigilance Approach.” *The Science of the Total Environment* 437 (October): 185–95.

Silva, Liliana J G, André M P T Pereira, Leonor M Meisel, Celeste M Lino, and Angelina Pena. 2014a. “A One-Year Follow-up Analysis of Antidepressants in Portuguese Wastewaters: Occurrence and Fate, Seasonal Influence, and Risk Assessment.” *The Science of the Total Environment* 490 (August): 279–87.

———. 2014b. “Reviewing the Serotonin Reuptake Inhibitors (SSRIs) Footprint in the Aquatic Biota: Uptake, Bioaccumulation and Ecotoxicology.” *Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)* 197C (December): 127–43.

Smyth, W Franklin, Julian C Leslie, Stephen McClean, Bernadette Hannigan, Hugh P McKenna, Bernadette Doherty, Clare Joyce, and Edmund O’Kane. 2006. “The Characterisation of Selected Antidepressant Drugs Using Electrospray Ionisation with Ion Trap Mass Spectrometry and with Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry and Their Determination by High-Performance Liquid Chromatography/electrospray Ionisation.” *Rapid Communications in Mass Spectrometry : RCM* 20 (11): 1637–42.

Stumpf, Marcus, Thomas A Ternes, Rolf-Dieter Wilken, and Wolfram Baumann. 1999. “Polar Drug Residues in Sewage and Natural Waters in the State of Rio de Janeiro, Brazil.” *Science of The Total Environment* 225 (1-2): 135–41.

Taggart, M A, R Cuthbert, D Das, C Sashikumar, D J Pain, R E Green, Y Feltrer, S Shultz, A A Cunningham, and A A Meharg. 2007. "Diclofenac Disposition in Indian Cow and Goat with Reference to Gyps Vulture Population Declines." *Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)* 147 (1): 60–65.

Thomas, Saji, Ashutosh Agarwal, Raghavendra Desai Rao, and Chandra S. Mathela. 2012. "CHARACTERIZATION OF AN UNKNOWN IMPURITY IN CITALOPRAM HYDROBROMIDE ACTIVE PHARMACEUTICAL INGREDIENT BY SEMI- PREPARATIVE ISOLATION AND LC-ESI/MSn AND NMR." *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 36 (14). Taylor & Francis: 1999–2012.

Unceta, Nora, M Aranzazu Goicolea, and Ramón J Barrio. 2011. "Analytical Procedures for the Determination of the Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Antidepressant Citalopram and Its Metabolites." *Biomedical Chromatography* 25 (1-2). John Wiley & Sons, Ltd.: 238–57.

Vasskog, Terje, Trude Anderssen, Stig Pedersen-Bjergaard, Roland Kallenborn, and Einar Jensen. 2008. "Occurrence of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors in Sewage and Receiving Waters at Spitsbergen and in Norway." *Journal of Chromatography. A* 1185 (2): 194–205.

Vasskog, Terje, Urs Berger, Per-Jostein Samuelsen, Roland Kallenborn, and Einar Jensen. 2006. "Selective Serotonin Reuptake Inhibitors in Sewage Influent and Effluents from Tromsø, Norway." *Journal of Chromatography. A* 1115 (1-2): 187–95.

Verenitch, Sergei S, Christopher J Lowe, and Asit Mazumder. 2006. "Determination of Acidic Drugs and Caffeine in Municipal Wastewaters and Receiving Waters by Gas Chromatography-Ion Trap Tandem Mass Spectrometry." *Journal of Chromatography. A* 1116 (1-2): 193–203.

Villar Navarro, Mercedes, María Ramos Payán, Rut Fernández-Torres, Miguel A Bello-López, Manuel Callejón Mochón, and Alfonso Guiráu Pérez. 2011. "Capillary Electrophoresis Determination of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs in Wastewater Using Hollow Fiber Liquid-Phase Microextraction." *ELECTROPHORESIS* 32 (16). WILEY-VCH Verlag: 2107–13.

Vione, Davide, Gianpaolo Falletti, Valter Maurino, Claudio Minero, Ezio Pelizzetti, Mery Malandrino, Roberto Ajassa, Romeo-Iulian Olariu, and Cecilia Arsene. 2006. “Sources and Sinks of Hydroxyl Radicals upon Irradiation of Natural Water Samples.” *Environmental Science & Technology* 40 (12): 3775–81.

Wang, Chuan, Honglan Shi, Craig D Adams, Sanjeewa Gamagedara, Isaac Stayton, Terry Timmons, and Yinfu Ma. 2011. “Investigation of Pharmaceuticals in Missouri Natural and Drinking Water Using High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry.” *Water Research* 45 (4): 1818–28.

Weigel, Stefan, Roland Kallenborn, and Heinrich Hühnerfuss. 2004. “Simultaneous Solid-Phase Extraction of Acidic, Neutral and Basic Pharmaceuticals from Aqueous Samples at Ambient (neutral) pH and Their Determination by Gas Chromatography–mass Spectrometry.” *Journal of Chromatography A* 1023 (2): 183–95.

Yuan, Xiangjuan, Zhimin Qiang, Weiwei Ben, Bing Zhu, and Jiuhui Qu. 2015. “Distribution, Mass Load and Environmental Impact of Multiple-Class Pharmaceuticals in Conventional and Upgraded Municipal Wastewater Treatment Plants in East China.” *Environ. Sci.: Processes Impacts*. The Royal Society of Chemistry.

Zhang, Jing, Li Zhang, Xiangqing Li, Shi-Zhao Kang, and Jin Mu. 2011. “Visible Light Photocatalytic Activity of Porphyrin Tin(IV) Sensitized TiO₂ Nanoparticles for the Degradation of 4-Nitrophenol and Methyl Orange.” *Journal of Dispersion Science and Technology* 32 (7). Taylor & Francis Group: 943–47.

Zhang, Nan, Guoguang Liu, Haijin Liu, Yingling Wang, Zhanwei He, and Gang Wang. 2011. “Diclofenac Photodegradation under Simulated Sunlight: Effect of Different Forms of Nitrogen and Kinetics.” *Journal of Hazardous Materials* 192 (1): 411–18.

Zhang, Yongjun, Sven-Uwe Geissen, and Carmen Gal. 2008. “Carbamazepine and Diclofenac: Removal in Wastewater Treatment Plants and Occurrence in Water Bodies.” *Chemosphere* 73 (8): 1151–61.